

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON
Année 1966 - N° 233

**ÉTUDE DE LA RÉPARTITION ET DE L'ÉVOLUTION
DES NUCLÉOTIDES LIBRES
au cours de l'athérosclérose expérimentale
du lapin**

THÈSE

présentée

A LA FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 21 décembre 1966
pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

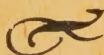
PAR

MÉROUZE Pierre

ÉLÈVE DE L'ÉCOLE DU SERVICE DE SANTÉ MILITAIRE

né le 30 novembre 1942

à MARRAKECH (Maroc)



Camille PEYRIN

Imprimeur

3, Rue du Jardin-des-Plantes

LYON

1966

**ÉTUDE DE LA RÉPARTITION ET DE L'ÉVOLUTION
DES NUCLÉOTIDES LIBRES
au cours de l'athérosclérose expérimentale
du lapin**

THÈSE

présentée

A LA FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 21 décembre 1966
pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

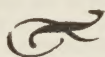
PAR

MÉROUZE Pierre

ÉLÈVE DE L'ÉCOLE DU SERVICE DE SANTÉ MILITAIRE

né le 30 novembre 1942

à MARRAKECH (Maroc)



Camille PEYRIN

Imprimeur

3, Rue du Jardin-des-Plantes

LYON

1966



PERSONNEL DE LA FACULTE

Doyens honoraires :

M. J. LEPINE, Membre de l'Institut.
M. H. HERMANN, Correspondant de l'Institut.

Doyen :

M. J. F. CIER.

Assesseurs :

M. M. LEVRAT.

M. J. DORCHE.

Conseiller Administratif :

M. H. PRUVOST

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. PATEL, LEPINE, TRILLAT, GARIN, GATE, MARTIN, GABRIELLE, SANTY, DUCLOS, GUILLEMINET, HERMANN, ROCHET, POLLOSSON, ENSELME, WERTHEIMER, SARROUY.

PROFESSEURS

MM.

J. CIBERT	Clinique Urologique.
P. PONTIUS	Physique Biologique.
(détaché à Beyrouth)	
M. CHAMRON	Chimie Organique et Toxicologie.
F. PAUPERT-RAVAULT	Clinique médicale B
R. FROMENT	Clinique et Prophylaxie cardio-vasculaires.
P. CROIZAT	Clinique médicale C.
P. MALLET-GUY	Clinique chirurgicale A.
L. REVOL	Pharmacie galénique.
H. PIGEAUD	Clinique obstétricale.
J. BOURRET	Médecine du Travail.
M. LEVRAT	Clinique médicale A.
R. SOHIER	Bactériologie.
G. NETIEN	Botanique et cryptogamie.
P. BERTRAND	Clinique chirurgicale C.
A. BADINAND	Chimie analytique pharmaceutique.
B. DREVON	Pharmacie chimique et Pharmacologie.
L. ROCHE	Médecine légale et Déontologie.
J. COUDERT	Parasitologie et Pathologie exotique.
P. MOUNIER-KUHN	Clinique d'Oto-Rhino-Laryngologie et d'Audiophonologie.
L. PAUFIQUE	Clinique Ophtalmologique.
H. THIERS	Clinique de Dermatologie, Syphiligraphie et Allergologie.
J. BRUN	Clinique de Pneumophtisiologie.
J. CREYSSEL	Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique.
M. DARGENT	Clinique carcinologique.
M. BERGER (1)	Physique nucléaire appliquée à la Médecine.
A. GUICHARD	Anatomie pathologique.
P. GIRARD	Pathologie générale et expérimentale.

M. GIRARD
M. LATARJET
R. PEYCELON
A. VACHON
P. GALY
J. PAPILLON
M. JEUNE
A. GONIN
P. MONNET
J. CHATONNET
P. GUINET
H. COLLET (1)
A. TRILLAT
Ch. FREIDEL
J. MARION
J. DORCHE
L. MANSUY (1)
L. REVOL (1)
J.-P. LECUIRE (1)
L.-P. DUMONT
H. LIARAS (1)
L. PERROT
J. F. CIER
J. PERRIN
P. GOINARD (1)
P. MICHAUD
M. PONT (1)
J. TRAEGER (1)
J. MATHIEU
G. FAUCON
A. BERTOYE
G. VIGNON
D. VINCENT
A. CIER
L. COLOBERT
X...
X...
X...
X...

Clinique médicale D.
Anatomie.
Clinique chirurgicale B.
Pathologie médicale.
Physio-pathologie des voies respiratoires.
Radiologie.
Clinique médicale infantile et Hygiène du 1^{er} âge
Thérapeutique.
Clinique médicale infantile B.
Physiologie B.
Clinique endocrinologique.
Chimie générale et pharmaceutique.
Clinique de Chirurgie orthopédique.
Clinique stomatologique.
Clinique de Chirurgie et d'Orthopédie infantiles.
Matière médicale et Législation pharmaceutique.
Neurochirurgie.
Hématologie.
Neurochirurgie.
Histologie et Embryologie.
Clinique chirurgicale propédeutique.
Chimie.
Physiologie A.
Thérapeutique chirurgicale et Chirurgie opératoire.
Clinique thérapeutique chirurgicale et chirurgie expérim.
Clinique de Chirurgie cardiaque.
Médecine générale.
Pathologie métabolique et rénale.
Clinique gynécologique.
Biologie médicale et Pharmacodynamie.
Clinique des Maladies infectieuses.
Hydrologie thérapeutique, climatologie et Ecologie sociale.
Biochimie appliquée.
Pharmacodynamie.
Chimie biologique et médicale.
Pathologie chirurgicale.
Clinique Neuro-psychiatrique et d'Hygiène mentale.
Physiologie et Pathologie obstétricales.
Hygiène et Action sanitaire et sociale.

(1) Professeurs à titre personnel.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM.

ROMAN
FEROLDI
MORET
ODDOUX
de SOLLIERS
DESPIERRES
GARIN
TOLOT
THIVOLET
MALLEIN

Parasitologie.
Anatomie pathologique.
Physique biologique.
Botanique et cryptogamie.
Chimie analytique.
Médecine générale.
Parasitologie.
Médecine du Travail.
Hygiène.
Chimie analytique.

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES TITULAIRES

MM.

CREYSSSEL R.
PINET

Chimie biologique.
Electro-radiologie.

GUYOTAT
 DESCOTES
 JOUVET
 PEYRIN
 TOMMASI
 BUFFARD
 LEJEUNE
 de MOURGUES Fr.
 NAUSSAC
 REBOUILLAT
 ROMAGNY
 DELAHAYE
 DELEUZE
 GIRAUD
 MICHEL
 FRANÇOIS
 MICHOUILLIER
 COLOMB
 LAMBERT
 FRIES
 GILLY
 ROBERT
 BOUCHET
 BETHENOD
 GERMAIN
 KALB
 LARBRE
 SOUSTELLE
 VIALA
 VINCENT
 GIROD
 GRAS
 COLIN
 BERTRAND
 MARET
 VIALIER-RAYNARD
 CHOLLAT
 FLEURETTE
 FLANDROIS
 MOREL
 TERMET
 FREDERICH
 DAUDET
 BRUNE
 LOMBARD-PLATET
 BOUVIER
 FREYCON
 LAPRAS
 PELLET
 DUQUESNEL
 DEJOUR
 MOULIN
 PERRIN-FAYOLLE
 PALIARD
 MORGON
 PAUPERT-RAVAULT M.
 MOTIN
 PASQUIER
 VAUZELLE
 CZYBA
 CABANAC
 TOURAINE
 BEL

Neuro-psychiatrie.
 Chirurgie générale.
 Pathologie expérimentale.
 Physique biologique.
 Anatomie pathologique.
 Electro-radiologie.
 Médecine générale et thérapeutique.
 Stomatologie.
 Maladies infectieuses.
 Chirurgie générale.
 Pédiatrie.
 Médecine générale.
 Anesthésiologie.
 Electro-radiologie diagnostic et thérapeutique.
 Anesthésiologie.
 Pédiatrie et Puériculture.
 Chirurgie générale.
 Dermatologie.
 Médecine générale.
 Médecine générale.
 Pédiatrie.
 Médecine générale.
 Anatomie.
 Pédiatrie.
 Immunologie, sérologie, hématologie.
 Pneumo-phtisiologie.
 Pédiatrie.
 Chirurgie générale.
 Médecine générale.
 Bactériologie, parasitologie, virologie.
 Histologie et embryologie.
 Chimie biologique.
 Médecine légale.
 Chimie biologique.
 Chirurgie générale.
 Bactériologie.
 Electro-radiologie.
 Bactériologie.
 Physiologie.
 Hématologie.
 Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire.
 Pharmacologie.
 Chirurgie infantile.
 Médecine générale et Thérapeutique.
 Chirurgie générale.
 Rhumatologie.
 Pédiatrie.
 Neuro-chirurgie.
 Physiologie.
 Electro-radiologie.
 Orthopédie et Traumatologie.
 Dermato-Vénérologie.
 Pneumo-phtisiologie.
 Médecine générale et Thérapeutique.
 O. R. L.
 Ophtalmologie.
 Anesthésiologie.
 Médecine générale et Thérapeutique.
 Anatomie pathologique.
 Histologie et Embryologie.
 Physiologie.
 Pneumo-phtisiologie.
 Médecine générale et Thérapeutique.

CHARVET
MAYER
SISTERON
BRAILLON
VILLIERS
LOUISOT
COURJON J. A.

Gynécologie obstétrique.
Cancérologie.
Chirurgie thoracique et Cardio-Vasculaire.
Anatomie et Chirurgie générale.
Chirurgie générale.
Chimie biologique.
Neuro-psychiatrie.

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES STAGIAIRES

MM.

FAVRE-GILLY
RIFFAT
ROLLET
BIZOLLON

Hématologie.
Hygiène.
Pharmacie galénique.
Physique.

AGREGES EN EXERCICE

MM.

BONAMOUR
FRANCILLON
NOTTER
DE MOURGUES G.
DUMONT Martial
SCHOTT
DEVIC
SAUBIER
DURAND
HUGONNIER
ALLEGRE
GARDE
FAYSSE
GAILLARD
PERRIN André
NORMAND
MOUNIER-KUHN Alain
MORNEX
CHASSARD
GARMIER
DUMAS
SCHNEPP
NOEL

Ophtalmologie.
Chirurgie générale.
Gynécologie obstétricale.
Chirurgie générale.
Obstétrique.
Neuro-Psychiatrie.
Médecine générale.
Chirurgie générale.
Urologie.
Ophtalmologie.
Neuro-chirurgie.
Médecine générale.
Orthopédie.
Oto-rhino-laryngologie.
Médecine générale.
Médecine générale.
Chirurgie générale.
Médecine générale.
Electro-radiologie.
Obstétrique.
Stomatologie.
Orthopédie.
Médecine générale.

EXAMINATEURS DE LA THESE

M. le Professeur COLOBERT, Président ;
MM. GRAS, BERTRAND, HENRY, M^{lle} GAUTHERON, assesseurs.

A LA MEMOIRE DE MA MERE

Qui reste toujours dans mon esprit un symbole de tendresse et d'amour.

A LA MEMOIRE DE MA GRAND-MERE

Qui sut remplir auprès de nous le rôle difficile d'une mère. Je dois à sa tendresse, à son dévouement, à son intelligence, bien plus que je ne saurais le dire ici.

A MON PERE

Avec mon admiration pour sa probité médicale et en témoignage de ma profonde affection et de ma reconnaissance pour le dévouement dont il a fait preuve en nous élevant.

A MA BELLE-MERE

A MES FRERES ET SŒURS

A TOUS LES MIENS

A MES AMIS



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553410_0025

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR LOUIS COLOBERT

Professeur de Chimie Biologique
à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon

Nous le remercions du grand honneur qu'il nous
fait en acceptant de présider notre jury de thèse.

A NOS JUGES

MONSIEUR LE PROFESSEUR J. GRAS

*Professeur de Chimie Biologique
à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon*

Il nous a accueilli avec bienveillance au Laboratoire de Chimie Biologique et a permis la réalisation de ce travail.

Nous lui sommes très reconnaissant des conseils qu'il a bien voulu nous prodiguer pendant les trois ans que nous avons passés dans ce Laboratoire. Sa compétence et sa rigueur scientifique nous ont été précieuses.

Il a bien voulu accepter de juger cette thèse. Qu'il en soit remercié et trouve, ici, l'expression de nos sentiments déferents.

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ J.-A. BERTRAND

*Professeur Agrégé de Biochimie
à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon*

Nous avons eu l'occasion d'apprécier ses grandes connaissances et son amabilité tout au long d'une année d'Enseignement Dirigé que nous avons effectué d'après ses cours.

Nous le remercions d'avoir bien voulu accepter de faire partie de notre jury de thèse.

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ J.-C. HENRY

*Professeur Agrégé de Biochimie
à l'Ecole de Médecine de Besançon*

Il a été notre Maître, nous initiant à la recherche en Biochimie avec une bienveillance et une gentillesse constantes.

Nous avons travaillé sous sa direction pendant trois ans, au cours desquels il ne nous a ménagé ni ses conseils, ni son aide.

Il nous a fait l'honneur de nous proposer ce travail et de nous guider dans sa réalisation. Nous le remercions de la confiance qu'il nous a témoignée.

Nous sommes heureux de le retrouver dans notre jury.

Qu'il trouve, ici, l'assurance de notre profond et respectueux attachement.

MADemoiselle LE PROFESSEUR DANIELLE GAUTHERON

*Professeur de Biochimie
à la Faculté des Sciences de Lyon*

Elle a inspiré cette thèse.

Nous avons eu le privilège de suivre, à la Faculté des Sciences, son enseignement dont nous avons apprécié la valeur et la clarté.

Nous lui devons beaucoup dans le choix de notre orientation.

Elle fut, pour nous, un guide précieux qui ne nous a jamais ménagé ses encouragements, chaque fois que nous avons eu l'occasion de nous adresser à elle.

Qu'elle veuille bien trouver ici l'expression de notre admiration et nos remerciements pour le grand honneur qu'elle nous fait en acceptant de siéger dans ce jury.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR D. VINCENT
Professeur de Biochimie Appliquée
à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon

Dont l'accueil nous fut toujours bienveillant.

AUX MEMBRES DU LABORATOIRE DE CHIMIE BIOLOGIQUE
Particulièrement :

Les Docteurs Danièle ROUSSET et Jean-François MOSKOVITCHENKO, pour leur aide amicale et leur gentillesse qui contribua à créer, dans ce Laboratoire, une ambiance de travail agréable.

Le Docteur Henri PERRIER, dont l'amitié nous a été, parfois, d'un précieux réconfort.

Mesdames Yvette GUDEFIN et Christiane ALRIC, qui nous prêtèrent leur concours avec une grande amabilité.

Mademoiselle ROY, en souvenir de nos conversations très éclectiques, et en la remerciant d'avoir participé à la présentation de ce travail.

Madame REYNAUD, aide de Laboratoire dévouée, qui nous fut, parfois, d'un grand secours.

A MONSIEUR LE MÉDECIN-COMMANDANT GIROUD

*Spécialiste des Hôpitaux des Armées
Ancien Chef de Clinique à la Faculté
Chef du Service d'Assistance Respiratoire
de l'Hôpital Militaire Desgenettes*

A MONSIEUR LE MÉDECIN-COMMANDANT RAMEL

*Neuropsychiatre des Hôpitaux des Armées
Chef du Service de Neuropsychiatrie
de l'Hôpital Militaire Desgenettes*

A MONSIEUR LE MÉDECIN-CAPITAINE BOUVIER

Neuropsychiatre des Hôpitaux des Armées

Nous gardons un excellent souvenir de l'année que nous avons passée auprès de lui, comme interne, et qui fut, pour nous, riche en enseignements.

Nous avons pu apprécier l'étendue de ses connaissances médicales, son intelligence et sa sensibilité.

Nous le remercions d'avoir su nous rendre agréable cette année et lui exprimons notre admiration et notre attachement.

A MONSIEUR LE MÉDECIN-COMMANDANT BOURREL DE LA RONCIERE

Assistant des Hôpitaux des Armées

A MADemoiselle VALETTE

Psychologue

Dont le sourire et l'entrain savaient alléger l'atmosphère, parfois tendue, du Service.



A MONSIEUR LE MÉDECIN-GÉNÉRAL INSPECTEUR BORON

*Professeur Agrégé du Val-de-Grâce
Directeur de l'Ecole du Service de Santé Militaire
et de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes*

A MONSIEUR LE MÉDECIN-COLONEL GROSSETETE

*Bactériologiste des Hôpitaux des Armées
Médecin-Chef de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes*

A NOS MAITRES

DE LA FACULTE DE MEDECINE DE LYON

DES HOPITAUX CIVILS

ET DE L'HOPITAL MILITAIRE D'INSTRUCTION DESGENETTES

INTRODUCTION

Le travail que nous présentons entre dans le cadre des différentes recherches entreprises depuis de nombreuses années dans les laboratoires de Chimie Biologique de la Faculté de Médecine et de Pharmacie et de la Faculté des Sciences de Lyon, sur les problèmes inhérents à l'établissement et à l'évolution du processus de l'athérosclérose.

On sait que cette affection apparaît, le plus souvent, au cours de la sénescence. Il était logique de penser que le métabolisme énergétique cellulaire pouvait être perturbé sous l'influence de l'atteinte pathologique.

Afin de vérifier, du moins partiellement, cette hypothèse, nous avons étudié les variations des nucléotides libres chez l'animal en état d'athérosclérose expérimentale.

Nos travaux ont porté sur trois tissus, isolés chez le lapin normal et chez le lapin athéroscléreux. Ce sont le tissu hépatique, le tissu cérébral et le tissu myocardique. Les raisons de notre choix sont les suivantes :

Le tissu hépatique présente, au cours de l'athérosclérose, une surcharge lipidique caractéristique qui se manifeste par l'apparition d'une stéatose. En outre, c'est au niveau du foie que s'effectue la biosynthèse du cholestérol, avec toutes les conséquences que nous connaissons.

Le cerveau est également atteint au cours de la maladie ; il présente, notamment, des complications vasculaires.

Le tissu myocardique, enfin, nous a semblé digne d'intérêt, d'abord pour ses rapports histologiques et embryologiques étroits avec l'aorte, et ensuite parce que, si de nombreux travaux, et en particulier ceux de notre Laboratoire, ont porté sur le tissu aortique, aucun, à notre connaissance, n'a pu être relevé, dans la littérature scientifique, au sujet du myocarde.

L'étude des nucléotides libres ne peut fournir, à elle seule, un tableau complet du métabolisme énergétique. La variation de ces composés représente, malgré tout, l'un des paramètres de ce métabolisme. Ce travail s'intégrera, donc, dans les diverses recherches entreprises à ce sujet dans le Service.

Nos travaux, ainsi que ceux portant sur la mesure des quotients respiratoires, des rapports P/O et des vitesses de renouvellement des dérivés phosphorylés riches en énergie, permettront, peut-être, de déterminer, de façon plus précise, les causes des altérations observées au cours de l'athérosclérose expérimentale.

CHAPITRE PREMIER

Les nucléotides * sont des composés phosphorés résultant de la combinaison d'une base azotée purique ou pyrimidique, d'une molécule d'ose à cinq atomes de carbone (ribose ou désoxyribose) et d'une ou plusieurs molécules d'acide phosphorique. Parmi les bases, nous pouvons citer l'adénine et la guanine (bases puriques), l'uracile, la cytosine et la thymine (bases pyrimidiques).

Les nucléotides peuvent exister isolés, associés à des molécules simples ou combinés entre eux, formant des oligonucléotides ou des polynucléotides. Les acides ribonucléiques et désoxyribonucléiques (ARN et ADN) se rangent parmi ces derniers. Les nucléotides isolés ou combinés à des molécules simples sont désignés par le terme de nucléotides libres, ou acido-solubles. Ils jouent un rôle essentiel dans tous les métabolismes ; ils fournissent des indications précises concernant le métabolisme énergétique et la biosynthèse des protéines, des glucides, des lipides et des ARN. Le transport actif à travers la membrane cellulaire se trouve également sous la dépendance de certains nucléotides.

Les esters phosphoriques acidosolubles et les nucléotides libres des divers tissus ont fait l'objet d'un grand nombre de travaux. Nous n'examinerons, ici, que les résultats de ceux qui se rapportent au tissu cérébral, au tissu hépatique et au tissu myocardique. Nous rattacherons à ce dernier tissu les études faites sur l'aorte.

* Nous utiliserons, pour désigner les différents nucléotides, les abréviations suivantes :

AMP = Adénosine monophosphate
ADP = Adénosine diphosphate
ATP = Adénosine triphosphate
CMP = Cytidine monophosphate
CDP = Cytidine diphosphate
CTP = Cytidine triphosphate
NAD = Nicotinamide Adénine
Dinucléotide

GMP = Guanosine monophosphate
GDP = Guanosine diphosphate
GTP = Guanosine triphosphate
UMP = Uridine monophosphate
UDP = Uridine diphosphate
UTP = Uridine triphosphate
NADP = Nicotinamide Adénine
Dinucléotide Phosphate

L'étude comparée de la répartition des nucléotides libres dans les tissus d'animaux normaux et athéromateux n'a été réalisée, jusqu'à présent, qu'au niveau de l'aorte et, en ce qui concerne les nucléotides adényliques, au niveau du foie.

Les premières études portaient, avant tout, sur le dosage de l'ATP et de l'AMP dans différents tissus. Puis, on mit en évidence, dans les divers tissus animaux et dans les bactéries, des nucléosides mono-, di- et triphosphates de l'adénine, de la guanine, de la cytosine et de l'uracile (SCHMITZ et coll., 1954 - a).

Dès lors, fut entreprise l'étude des nucléotides des tissus cérébraux. SCHMITZ et coll. (1954 - b) adaptèrent la méthode de chromatographie sur colonne de COHN à l'étude des nucléotides du cerveau. Ils mirent en évidence plusieurs fractions de nucléotides parmi lesquelles ils identifièrent, en particulier, les nucléotides adényliques (ATP, ADP, AMP, NAD) en grande quantité, ainsi que du GTP et de l'UTP.

COPER, HERKEN et KORANSKY (1954), puis COPER (1956) et KORANSKY (1956), utilisèrent la méthode mise au point par SCHMITZ et coll. pour analyser la répartition des nucléotides du cerveau du rat. Ces études ont montré la présence, dans le cerveau, de nucléotides libres de diverses bases : l'ATP, relativement très important, était accompagné d'ADP, d'AMP et de NAD ; l'UMP et l'IMP furent, aussi, mis en évidence, ainsi que le GMP, assez important, l'UTP et le GTP en petites quantités.

Ces auteurs étudièrent, parallèlement, l'évolution de ces nucléotides sous l'action d'agents pharmacologiques, notamment des agents convulsivants, et montrèrent que ces derniers entraînaient, dans le système nerveux central, une chute des nucléotides riches en énergie, ATP en particulier.

DORING et GERLACH (1957) étudièrent la répartition des nucléotides libres du cerveau par chromatographie sur papier. L'animal utilisé était le rat, qu'ils soumettaient à une anesthésie et à une oxygénation par respiration artificielle après trachéotomie, puis qu'ils décapitaient. Ils obtinrent des valeurs d'ATP supérieures à celles d'autres auteurs (177 μ Moles/100 g de poids frais). L'ADP ainsi que l'AMP se retrou-

vaient, encore, en assez grande quantité (le rapport ATP/ADP était de 3,1). Les GDP, GTP et UTP étaient mis en évidence.

Après décapitation sans narcose préalable, ils constatèrent une baisse de la valeur d'ATP. L'ATP dosé après décapitation sous anesthésie ne leur semblait pas être dû à une accumulation.

MANDEL et HARTH (1957), rapportèrent quelques données quantitatives sur les nucléotides libres du cerveau de rat et de lapin, grâce à la méthode de SCHMITZ et coll., après décapitation et congélation de la tête dans la neige carbonique.

A côté des nucléotides mono-, di- et triphosphates de l'adénine et de la guanine, ils montrèrent la présence de NAD, d'IMP, d'UTP et d'UDP-glucose. Critiquées, depuis, pour les conditions d'analyse (MANDEL et HARTH, 1960), ces valeurs donnaient 55 % de nucléotides adényliques, 15 % de nucléotides guanyliques, 11 % de nucléotides uridyliques et 11 % d'IMP, chez le rat. Chez le lapin, ces rapports étaient, respectivement, de 49 %, 20 %, 16 % et 4 %. L'AMP prédominait nettement.

MANDEL et HARTH (1960) corrigèrent, pour le rat, les valeurs qu'ils avaient rapportées précédemment. Après anesthésie par 30 mg de chloral par kg de poids, suivie de décapitation de l'animal, la tête était plongée dans l'air liquide. L'AMP, le GMP et l'UMP étaient retrouvés en quantité très faible ; l'ATP et le GTP représentaient, respectivement, 95 % et 76 % des nucléotides adényliques et guanyliques. L'UTP représentait 55 % des uridyliques, tandis que le taux d'UDP lié aux oses était égal à 30 %.

KANIG et KORANSKY, en 1961, constatèrent que la narcose et la congélation préalable de rats entiers sacrifiés, permettaient un enrichissement en phosphate énergétique. Par contre, ils notèrent un appauvrissement de l'extrait cérébral en nucléotides, sous l'influence du calcium du tissu osseux introduit lors des manipulations de prélèvement.

Etudiant, aussi, la variation des nucléotides avec l'âge des animaux, ils constatèrent une diminution de la masse totale de ces composés, lors du vieillissement.

MANDEL et WEILL (1962), utilisant encore la méthode d'anesthésie suivie de décapitation et de congélation de la tête entière, retrouvèrent,

dans le cerveau de lapin, d'importantes quantités d'ATP (111 μ moles/100 g de poids frais), d'ADP (36,3 μ moles/100 g de poids frais) et d'AMP. Ces nucléotides étaient accompagnés de GTP, de GDP et d'UTP ; l'UMP et le GMP étaient retrouvés en petites quantités, tandis que l'IMP était assez important (21,1 μ moles/100 g de poids frais).

Cette dernière valeur, contrastant avec les faibles valeurs d'IMP rencontrées chez la souris, fut attribuée, par les auteurs, à la durée plus importante nécessaire pour la congélation de la tête, ce qui entraîne la désamination de l'AMP.

Le NAD n'était retrouvé qu'à l'état de traces.

En 1965, EDEL et coll. s'attachèrent à séparer, par lyophilisation et dissection du cerveau, le cortex du reste de la substance cérébrale, pour y doser les nucléotides libres. Ils constatèrent que le rapport ATP/ADP était assez élevé et que le taux du GTP était très important. Selon leurs résultats, le taux d'ATP du neurone est 5,5 fois plus élevé que celui du foie.

RAMUZ et MANDEL (1963) étudièrent l'effet des hormones sur les nucléotides adényliques libres du cerveau de rat. L'adjonction de thyroxine ou d'hydrocortisone, la thyroïdectomie n'ont aucun effet décelable. Par contre, la surrénalectomie provoque une baisse de l'ATP et du rapport ATP/ADP, témoignant d'une baisse globale du niveau des phosphorylations oxydatives.

La variation des nucléotides du cerveau de rat au cours de la croissance fut étudiée par EDEL et MANDEL (1965). Ils constatèrent une baisse passagère de la somme des nucléotides de 381 à 289 μ moles/100 g de poids frais, suivie d'une augmentation jusqu'à 357 μ moles au 35^e jour. Chez l'adulte, le taux se stabilise à 300 μ moles/100 g de poids frais.

L'ATP, le GTP et l'UTP augmentent, tandis que le CTP baisse (cette dernière diminution serait, donc, un facteur limitant dans la biosynthèse des ARN).

Enfin, des travaux récents (EDEL et REIN-LOVTRUP, 1966), ont appliqué à l'étude des nucléotides libres du système nerveux central de mammifères et de vertébrés inférieurs la méthode de lyophilisation suivie de fixation du cerveau par l'alcool-acétone. Les quantités de

nucléotides libérés sont supérieures (pour l'ATP et le GTP, en particulier) à celles obtenues par toutes les autres méthodes. Ceci pourrait, selon les auteurs, s'expliquer par la libération de nucléotides associés à des enzymes ou engagés dans des complexes lipoprotéiques.

Les rapports ATP/ADP et GTP/GDP sont très élevés chez tous ces vertébrés, les adényliques constituant la majorité des nucléotides libres.

Par ailleurs, EDEL et POIREL (1966), étudiant, sur le rat, l'évolution des nucléotides libres du cerveau au cours de la croissance post-natale, ont constaté que celle-ci s'accompagne d'une augmentation considérable des nucléotides adényliques, ATP en particulier, contrastant avec une réduction du CTP, surtout, du GTP et de l'UTP. Cette réduction du CTP pourrait être, selon les auteurs, le facteur intervenant dans l'arrêt de la croissance.

PECHAN et MARKO (1963), établirent une comparaison entre les répartitions des nucléotides libres dans le foie et dans le cerveau du cobaye. Les chromatogrammes respectifs de ces deux organes se superposent, selon les auteurs. Les esters triphosphoriques prédominent vis-à-vis des dérivés mono- et diphosphoriques.

Les nucléotides libres du foie furent étudiés par CEVELEVA et LIBINZON (1962) chez le lapin. Ces auteurs isolèrent des mono-, di- et triphosphates d'adénosine, de guanine et d'uridine, mais seulement des monophosphates de cytidine et d'inosine. La vitesse d'incorporation du Phosphore 32 est plus faible dans les nucléotides guanyliques et uridyliques que dans les nucléotides adényliques.

HENRY et coll. (1966 - b) ont étudié l'évolution des nucléotides adényliques du foie de lapin au cours de l'athérosclérose expérimentale et ont montré une diminution globale de ces nucléotides riches en énergie et du rapport ATP/ADP. Le NAD, retrouvé en quantité appréciable, ne varie pas.

En 1958, MANDEL et coll. émirent l'idée que l'athérome pouvait être comparé, du point de vue métabolique, à un vieillissement de la paroi artérielle (baisse du métabolisme énergétique dans les

deux cas). La teneur du tissu aortique en nucléotides riches en énergie diminue dans les traumatismes tissulaires toxiques ou infectieux ; ceci rendrait possible, selon les auteurs, la fixation de lipides, laquelle pourrait être à l'origine de l'athérome.

MANDEL et KEMPF (1961), étudiant la répartition des nucléotides libres dans le tissu aortique, sur des aortes de bovidés, congelées après prélèvement, ont observé un taux élevé de nucléotides adényliques (52 % des nucléotides, contre 17,8 % aux uridyliques, 13,7 % aux cytidiques, 9,2 % aux guanyliques). L'AMP est, relativement, le plus important de ces nucléotides (29 μ moles/100 g de poids frais), alors que l'ADP et l'ATP sont en petite quantité (respectivement 8,46 et 1,34 μ moles/100 g de poids frais).

KEMPF, FONTAINE et MANDEL (1961 - a) ont comparé ces résultats aux valeurs obtenues sur des aortes de bovidés âgés. Ils constatèrent une baisse globale des nucléotides énergétiques. Ils en déduisirent que le phénomène primaire du vieillissement serait une réduction du métabolisme énergétique, d'où une baisse de l'ATP, en particulier.

KEMPF et MANDEL (1961 - b) ont comparé, ensuite, les taux des nucléotides libres des aortes de bovidés adultes et âgés. Ils constatèrent encore une baisse des nucléotides adényliques et uridyliques, tandis que le CDP-coenzyme est peu modifié.

MANDEL (1962) a résumé ces résultats et pense que la diminution du métabolisme énergétique de la paroi artérielle a un rôle dans la genèse de l'athérome : cette diminution permettrait la fixation exagérée des lipides au niveau de la paroi artérielle.

BARBARESI et coll. (1964) ont étudié la répartition des nucléotides libres du myocarde de rat. Ils mettent en évidence la présence de nucléotides adényliques (ATP en grande quantité, ADP, AMP et NAD), d'IMP, de CTP, de GTP, de GDP et de GMP. UMP et UTP sont encore retrouvés, en quantités extrêmement faibles. Selon ces auteurs, la congélation préalable des animaux entiers dans l'acétone après anesthésie permet d'obtenir des valeurs d'ATP plus importantes. Cependant, la somme des nucléotides adényliques obtenus, avec ou sans congélation est identique.

HENRY, GAUTHERON et GRAS (1964), HENRY et GAUTHERON (1965), HENRY et coll. (1966 - a) ont constaté que l'ATP est en quantité très importante dans la paroi aortique du lapin. Le rapport ATP/ADP est voisin de 0,6. L'AMP n'est retrouvé qu'à l'état de traces indosables. La teneur en NAD est importante.

• Chez le lapin soumis à un régime athérosclérogène, ces auteurs voient le taux d'ATP diminuer de 43 % après deux mois de traitement. Le taux d'ADP varie parallèlement, de même que le rapport ATP/ADP. Le NAD ne varie pas notablement et il n'y a pas apparition d'AMP.

HENRY, GAUTHERON et coll. (1965 - a et b) ont étudié la variation des nucléotides adényliques du tissu aortique du lapin, sous l'effet de l'adrénaline. Ils ont constaté une diminution très marquée des nucléotides, cette diminution étant plus sensible chez les animaux soumis à un régime athérosclérogène. Le retour à la normale est plus lent, chez ces derniers, que chez les animaux normaux. Ces auteurs n'ont jamais observé d'accumulation notable de 5' AMP ou de 3'-5' AMP cyclique.

Nous ne ferons que citer, pour terminer, les travaux de SAUKHONEN (1956), qui mit en évidence des nucléotides libres dans différents tissus, de GRÉGOIRE, GRÉGOIRE et LIMOZIN (1958), qui recherchèrent ces composés chez des bactéries et les travaux se rapportant aux nucléotides libres de différents organes, tels le tissu splénique de rat (CHAMBON et MANDEL, 1959), le cristallin de veau (KLETHI et MANDEL, 1957 - MANDEL et KLETHI, 1958) et de bovidés âgés (MANDEL, KLETHI et VIRMEAUX, 1958), la glande thyroïde (LISSITZKY et coll. 1959) et, enfin, l'utérus de rat (VOLFIN, CLAUSER, GAUTHERON et EBOUÉ, 1961).

CHAPITRE II

TECHNIQUES D'ISOLEMENT ET DE DOSAGE DES NUCLEOTIDES

- I. Généralités.
- II. Chromatographie en couche mince.
- III. Chromatographie sur papier échangeur d'anions
- IV. Ionophorèse à haute tension.
- V. Chromatographie sur colonne.
- VI. Chromatographie bidimensionnelle sur papier.

I. — GENERALITES

Dans les milieux biologiques, les nucléotides existent soit sous une forme complexée, incorporée dans des macromolécules (polynucléotides, acides nucléiques), soit sous une forme non complexée. On les désigne, alors, sous le terme de « nucléotides libres ».

L'isolement des nucléotides libres doit donc comporter, en premier lieu, l'élimination des macromolécules. On la réalise en précipitant les hauts polymères par des solutions acides relativement diluées, tels l'acide trichloracétique à 10 % ou l'acide perchlorique 0,6 N, les nucléotides libres étant solubles dans la phase acide.

Pour respecter les nucléotides qui ont une activité co-enzymatique, notamment les dinucléotides de type nicotinique, tels le Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD) et le Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (NADP), encore appelés DPN et TPN, qui sont sensibles à l'action des acides, on peut précipiter les macromolécules par l'éthanol à 70 %. Mais le choix de la méthode de précipitation par l'acide trichloracétique ou perchlorique, qui est la plus utilisée, repose sur le fait qu'elle permet d'éliminer simultanément les protéines et les lipides et de solubiliser les nucléotides libres. Ceci explique que l'on utilise habituellement, pour les désigner, le terme de nucléotides acidosolubles.

Après obtention des nucléotides dans une phase acide ou alcoolique, diverses méthodes ont été préconisées pour leur isolement, leur identification et leur dosage. Nous envisagerons successivement les méthodes de chromatographie en couche mince, sur papier échangeur d'anions, l'électrophorèse à haute tension, la chromatographie sur colonne de résine échangeuse d'ions et, en dernier lieu, la chromatographie bidimensionnelle sur papier.

Mais, avant d'aborder l'étude de ces différentes techniques, il convient de signaler brièvement les premiers procédés utilisés, faisant appel, essentiellement, à la précipitation de nucléotides par des sels de métaux lourds, tels que les sels d'argent, de zinc, de baryum ou de plomb (LEVÈNE et BASE, 1931). La technique la plus courante comporte une séparation des divers esters phosphoriques acidosolubles et des nucléotides à l'état de sels de baryum ou de calcium, en faisant varier le pH et la concentration en éthanol (UMBREIT et coll., 1957).

Ce sont, avant tout, des composés adényliques qui furent isolés de cette façon. Pour évaluer la teneur en ATP et en ADP, on mettait à profit la propriété des liaisons phosphates β de l'ADP, β et γ de l'ATP, d'être facilement hydrolysées. On assimilait ces ions phosphates, libérés dans des solutions acides normales, en 10 minutes à 100° C, aux phosphates riches en énergie des nucléotides adényliques. En réalité, on dosait, de cette manière, les liaisons phosphorées riches en énergie de tous les nucléotides libres.

En dehors des méthodes précédemment évoquées, que nous nous proposons de décrire en détail, nous ne ferons que rappeler deux techniques de dosage particulières, dues à STREHLER et TOTTER (1954).

La première, d'utilisation courante en biologie clinique, évalue les NAD et NADP liés à la plupart des déshydrogénases, grâce au déplacement de leur spectre d'absorption dans l'ultra-violet, selon que ces composés sont présents, dans le milieu réactionnel, sous la forme oxydée ou réduite.

La seconde utilise la propriété de la luciférase extraite des vers luisants (*Photynus pyralis*) de donner une fluorescence en présence d'ATP.

Cependant, si les méthodes enzymatiques sont très sensibles, elles ne sont pas toujours parfaitement spécifiques et il faut compter avec la présence toujours possible d'effecteurs susceptibles d'influencer de façon très marquée le processus réactionnel et, donc, le résultat final.

II. — LA CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

Cette méthode de chromatographie consiste à faire migrer le mélange étudié sur un adsorbant étalé en couche mince sur une plaque de verre. Cette dernière, maintenue verticalement dans la chambre à chromatographie, est en contact, par l'un de ses bords, avec un système solvant déterminé. RANDERATH (1962) (a) et (b), en particulier, utilisa cette technique pour réaliser la séparation de nucléotides. Nous décrivons, ici, la méthode récente, adaptée de celle de RANDERATH, employée par JAROSCEWICZ et LIEBECQ (1964).

L'isolement des nucléotides libres est effectué sur couche mince d'un mélange constitué par de la diéthylaminoéthylcellulose (DEAE-cellulose) et de la cellulose ordinaire dans le rapport 4/1.

L'acide chlorhydrique dilué déplace les monophosphates des ribosides. Au fur et à mesure qu'on augmente la concentration en acide chlorhydrique, les di-, puis les triphosphates sont successivement entraînés.

Le NAD et le NADP migrent, respectivement, à la vitesse d'un mono- et d'un diphosphate.

L'adénosine tétraphosphate se déplace plus lentement que l'ATP, dont elle se sépare correctement. Toutefois, sa vitesse de migration est proche de celles de l'ITP, produit de désamination de l'ATP, et de l'UTP.

Une meilleure séparation de ces composés est obtenue par l'emploi d'un deuxième système solvant, décrit par RANDERATH (sulfate d'ammonium saturé, acétate de sodium M, isopropanol : 80/ 18/ 2).

Une chromatographie bidimensionnelle, utilisant l'acide chlorhydrique 0,08 N dans la première dimension et le système solvant ci-dessus dans la deuxième dimension, permet de séparer correctement l'adénosine tétraphosphate des nucléotides triphosphates.

Pour réussir la séparation par le deuxième système solvant, il est

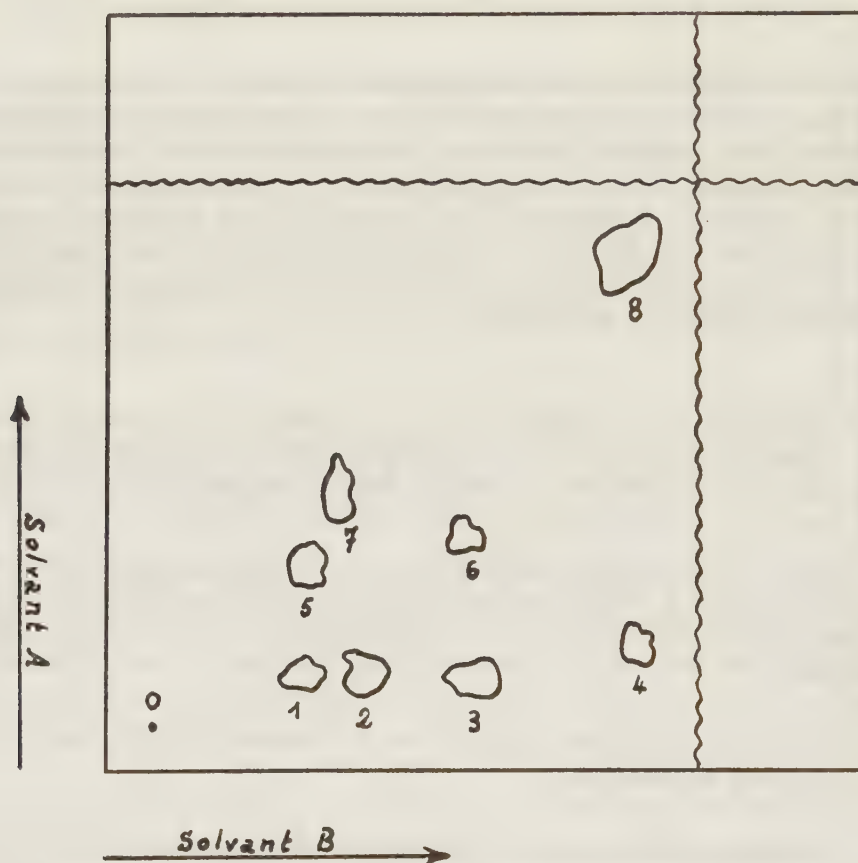


Fig. 1. — Chromatographie bidimensionnelle en couche mince
Solvant A : (n butanol, eau, acide formique 90 % : 60/10/30).
Solvant B : (n butanol, éthanol, acide chlorhydrique 5 N : 30/10/20).
Migration 2 h - 2 h 30 sur plaques 20 × 20 cm.
0 : origine, 1 : dGMP, 2 : dAMP, 3 : dCMP, 4 : dTMP, 5 : dG,
6 : dC, 7 : dA, 8 : dT.

nécessaire d'éliminer, auparavant, l'acide chlorhydrique du premier solvant par trois développements intermédiaires effectués dans la deuxième dimension, à l'aide, d'une part, d'acétone contenant 6 à 7 volumes de triéthylamine, puis d'acétone pure (deux fois).

L'élution quantitative des nucléotides ainsi séparés est réalisée, après révélation en lumière ultraviolette, par une solution d'acide chlorhydrique 0,2 N (1 à 2 ml par spot de nucléotide). Une mesure spectrophotométrique à 257-260 m μ permet d'obtenir la valeur du constituant ainsi isolé.

Par cette méthode, une détermination quantitative des nucléotides de l'adénine peut être effectuée avec une précision de l'ordre de 98 à 100 %.

A titre d'exemple de chromatographie en couche mince, nous rapportons, dans la figure 1, le schéma de migration de nucléotides donné par CHMIELEWICZ et ACARA (1964).

III. — LA CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER ECHANGEUR D'ANIONS

Une méthode d'isolement utilisant du papier à chromatographie imprégné d'un échangeur d'ions a été préconisée par RANDERATH (1963). Intéressante parce que rapide, elle comporte les principaux temps suivants :

On ajoute 500 ml d'eau distillée à 100 g d'une solution à 50 % de polyéthylène-imine (poly-EI) dans l'eau. On agite la solution jusqu'à ce que toute la poly-EI soit dissoute. Elle est, alors, neutralisée par de l'acide chlorhydrique concentré et complétée à 2,000 ml avec de l'eau distillée.

Des feuilles de papier à chromatographie Whatman n° 1, lavées, au préalable, à l'eau distillée, sont plongées pendant quelques secondes dans la solution de poly-EI, puis séchées dans un courant d'air chaud. Elles sont, ensuite, lavées à l'eau distillée et séchées à l'air. L'azote contenu dans le papier peut être augmenté ou diminué, selon qu'on augmente ou que l'on diminue la concentration de la solution de polyéthylène-imine.

On dépose les échantillons que l'on veut soumettre à la chromatographie à 2 cm du bord de la feuille de papier, à l'aide d'une micropipette. Après séchage, on pratique une chromatographie ascendante dans une cuve ouverte, le papier étant fixé à une baguette de verre. Les solvants utilisés sont constitués par des solutions électrolytes neutres (par exemple, chlorure de sodium 0,1 M). Le chromatogramme développé est, alors, séché immédiatement dans un courant d'air chaud.

On localise les composés à l'aide d'une lampe à rayons ultraviolets (254 m μ).

Les nucléotides mono-, di- et triphosphates sont séparés en 10 à 30 minutes.

Dans certains cas, la répétition de la chromatographie permet une meilleure séparation : après la première chromatographie, le papier est lavé à l'eau distillée, séché, puis développé une seconde fois, avec le même solvant. Cette opération peut être répétée plusieurs fois.

Les valeurs des Rf (migration par rapport au front du solvant) obtenues par ce procédé utilisant le chlorure de sodium 0,1 M comme solvant, couvrant une distance de 10 cm en 25 à 30 minutes, sont reproduites dans le tableau I (n = nombre de développements et F représente la migration avec le front du solvant).

TABLEAU I

Rf des nucléotides libres séparés par chromatographie
sur papier échangeur d'anions (RANDERATH, 1963)

Nucléotides	n = 1	n = 2	n = 3
AMP	0,63	0,83	F
ADP	0,37	0,63	0,83
ATP	0,12	0,25	0,32
GMP	0,58	0,80	F
GDP	0,27	0,47	0,65
GTP	0,07	0,17	0,23
CMP	0,77	F	F
CDP	0,46	0,76	F
CTP	0,15	0,30	0,44
UMP	0,86	F	F
UDP	0,57	0,87	F
UTP	0,21	0,40	0,59

IV. — L'IONOPHORESE A HAUTE TENSION

MARKHAM et SCHMITH (1952), puis WADE et MORGAN (1954) ont décrit des procédés utilisant l'ionophorèse à haute tension pour séparer les phosphates en général et les nucléotides en particulier. BERGVIST (1957) utilise une combinaison de la chromatographie sur papier et de l'ionophorèse. HEALD, en 1956, adapta l'ionophorèse à haute tension à l'isolement des nucléotides de certains extraits tissulaires, notamment d'extraits cérébraux. C'est cette méthode que nous décrirons.

1. Préparation des extraits.

Les tissus (200 à 300 mg de poids frais) sont broyés en fine suspension dans un récipient de verre, en présence de 3 ml d'acide trichloracétique glacial à 10 % (TCA 10 %). Cette suspension est, ensuite, centrifugée à $25\,000 \times g$ dans une centrifugeuse réfrigérée, durant 15 minutes.

Les culots sont extraits de nouveau par 2 ml de TCA à 5 % et l'on ajuste le surnageant à l'aide de potasse 5 N et 0,1 N, jusqu'à obtention du virage au rose de la phénolphthaléine. On ajoute, alors, 1 ml d'acétate de baryum à 25 % ; après avoir gardé la suspension à 0° C pendant 15 minutes, on la soumet à une centrifugation à $4\,500 \times g$, à une température de 0° C, pendant 15 minutes.

Le culot est dissous dans 2 ml d'acide chlorhydrique 0,1 N et reprécipité à pH 8,0 par 0,1 ml de solution d'acétate de baryum. Après 15 minutes à 0° C, on centrifuge et on obtient des phosphates, sous forme de sels de baryum insolubles, au niveau du culot.

Le surnageant est précipité par cinq volumes d'éthanol à 95° et on ajoute une quantité de potasse 5 N suffisante pour obtenir le virage au rose de la phénolphthaléine. Après avoir laissé la solution pendant une

ou deux heures à 0° C, on la centrifuge et on obtient, au niveau du culot, des phosphates sous forme de sels de baryum solubles dans l'eau, mais insolubles dans l'alcool.

Il faut, ensuite, déplacer le baryum de ces complexes obtenus. On distingue deux cas :

— Pour les sels de baryum insolubles dans l'eau, on met cette fraction en suspension dans 3 ml d'eau et on agite avec 200 à 300 mg de résine échangeuse de cations, de type Zeo-Karb 315 (H^+) (90 - 120 mesh), durant 3 à 5 minutes, à une température de 2° C. On la soumet, ensuite, à une centrifugation et le culot est lavé deux fois avec 2 ml d'eau.

Le surnageant est transféré dans une ampoule de verre et on ajoute une goutte d'ammoniaque concentré ; la solution est, alors, congelée à —20° C. L'eau est évaporée sous vide sur anhydride phosphorique à 2° C. Le résidu est placé dans 0,1 ou 0,2 ml d'eau, centrifugé afin de supprimer certaines impuretés et le surnageant est déposé sur le papier.

— Pour les sels de baryum solubles dans l'eau, mais précipités par l'éthanol, on dissout cette fraction dans 3 ml d'eau glacée et on l'agite avec 200 à 300 mg de Zeo-Karb 315 (NH_4^+) durant une minute. Elle est ensuite, rapidement centrifugée à 0° C, le culot extrait deux fois avec 2 ml d'eau glacée et le surnageant est traité comme indiqué ci-dessus.

2. Préparation du papier.

Le papier utilisé pour pratiquer l'ionophorèse peut être soit du papier Whatman N° 1, soit du papier Whatman N° 3MM.

On le lave, avant de l'utiliser, avec de l'acide chlorhydrique N, puis avec de l'acide éthylène-diamine-trétracétique (versène) à 0,5 % dans de l'ammoniaque N, ensuite avec de l'acide chlorhydrique N, puis de l'acide acétique N et, enfin, avec de l'eau distillée. On pratique un lavage à l'eau distillée après chaque lavage acide ou alcalin. Le traitement réduit le phosphore contenu dans le papier à 0,02 - 0,03 $\mu gP/cm^2$.

3. Ionophorèse.

Après avoir déposé sur le papier le produit à analyser, on procède à la migration électrophorétique. Les tampons utilisés sont soit de

l'acétate de sodium - acide acétique 0,05 M (pH 4,0), soit de l'aminotrihydroxyméthylméthane (Tris) 0,05 M, ajusté à pH 8,6 avec de l'acide chlorhydrique.

On applique une différence de potentiel de 350 à 450 volts et on maintient une intensité de 0,5 à 0,8 milli-ampères pendant 6 à 7 heures. Le papier est alors enlevé, séché à 80° C et révélé par vaporisation de molybdate d'ammonium 0,25 % dans de l'acide sulfurique N. Il est, ensuite, séché à 80° C, revaporisé légèrement et développé, enfin, sous une lampe à rayons ultraviolets dont on a ôté le verre de Wood. Les phosphates apparaissent en bleu sur fond blanc.

Les nucléotides sont identifiés d'après la migration de témoins que l'on a déposés sur le papier à ionophorèse. Les R_f des phosphates (distances de migration obtenues, par rapport à celle de l'orthophosphate inorganique, calculées à partir du centre des spots), sont les suivantes :

Solvant acide acétique-acétate de sodium 0,05 M (pH 4,0) sur papier Whatman N° 3 MM :

Orthophosphate : 1,0 ; ATP : 0,90 ; ADP : 0,75 ; ITP : 0,90.

Solvant Tris 0,05 M (pH 8,6) sur papier Whatman N° 3 MM.

Orthophosphate : 1,0 ; ATP : 0,70 ; ADP : 0,70 ; AMP : 0,61 ; NAD : 0,31 ; ITP : 0,70.

4. La détermination quantitative du phosphore.

Elle est effectuée par la méthode de BERENBLUM et CHAIN (1938), qui sera détaillée plus loin (« Chromatographie bidimensionnelle sur papier »). Les surfaces de papier, délimitées sous ultraviolets, sont découpées et minéralisées dans 0,5 ml du mélange minéralisant de HANES et ISHERWOOD (1949) (acide sulfurique pur, 3 volumes, acide perchlorique 60 %, 2 volumes).

Après cette opération, les solutions, refroidies, sont ajustées à l'aide de soude à 20 % en quantité suffisante pour obtenir un virage de la phénolphthaleïne et diluées à 5 - 6 ml avec de l'eau distillée. On ajoute alors de l'acide sulfurique 10 N, afin d'amener la concentration finale en acide sulfurique à la normalité. Les solutions sont chauffées pendant 20 à 30 minutes, à 100° C, puis refroidies, et le dosage du phosphore peut, alors, être entrepris.

V. — LA CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE

Un progrès considérable a été réalisé dans l'identification et le dosage des nucléotides tissulaires, depuis l'introduction par COHN (1950) de la chromatographie sur résines échangeuses d'ions. Grâce aux travaux de l'école de POTTER (SCHMITZ et coll., 1955 ; HURLBERT et coll., 1954 ; SCHMITZ, HURLBERT et POTTER, 1954 (a) ; SCHMITZ et coll, 1954 (b), une méthode dérivée de celle de COHN a pu être élaborée. Elle comporte une adsorption des nucléotides acidosolubles, isolés à partir des tissus, sur une colonne de résine échangeuse d'anions, suivie d'une élution progressive avec des solutions d'acide formique et de formiate d'ammonium d'un gradient de force ionique et de pH croissant.

Nous examinerons, d'abord, le détail de cette méthode, avant de citer les modifications qu'ont apportées MANDEL et coll. (notamment KLETHI et MANDEL - 1957, KEMPF et MANDEL - 1961).

1. Préparation de la fraction acidosoluble.

Les tissus sont prélevés rapidement, plongés dans l'air liquide, puis broyés dans un mortier en acier. Ils sont, ensuite, soumis à une homogénéisation dans un homogénéiseur type Potter-Elvehjem avec 2 volumes d'acide perchlorique froid 0,6 N. On soumet les protéines précipitées à une centrifugation et à une extraction par 2 volumes d'acide perchlorique 0,2 N. Le surnageant, placé dans un récipient réfrigéré, est amené à un pH voisin de la neutralité par affusions successives de potasse 5 N, en présence de phénol rouge comme indicateur interne.

Le perchlorate de potassium, sel particulièrement soluble, est précipité aussi complètement que possible en refroidissant la solution jusqu'à ce qu'elle soit presque prise en glace. On centrifuge à basse

température et le surnageant, filtré, sera utilisé pour la chromatographie (le phénol rouge sera retenu par la colonne, même pendant l'élution).

2. Préparation de la colonne.

On utilise une résine de type Dowex 1 (chlorure) X-10 (200 à 400 mesh). Les particules les plus fines et les plus grossières sont éliminées par sédimentation. Afin de les obtenir sous la forme formiate, on lave les colonnes de résine avec du formiate de sodium 3 M, jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'ion chlorure dans le liquide de lavage et, ensuite, avec de l'eau.

On place la résine dans une colonne de verre présentant, à la partie inférieure, un rétrécissement sur lequel repose un disque de verre cintré, couvert de laine de verre ou un disque gaufré, fait d'un lourd tampon de papier filtre. La résine est tassée, sous une faible pression d'air, en sections uniformes de 2 cm. Un autre disque gaufré est placé au sommet de la colonne.

La colonne est préalablement lavée avec 5 ou 10 volumes, égaux à celui de la résine, d'un mélange d'acide formique 0,6 N et de formiate de sodium 1 M, puis par plusieurs volumes d'acide formique à 88 %, enfin par de l'eau jusqu'à ce que le liquide effluent ne soit plus acide. Le lavage à l'acide formique concentré entraîne une certaine quantité de matières colorées et réduit l'absorption en lumière ultraviolette du chromatogramme. On peut régénérer les colonnes ayant servi à la chromatographie en leur appliquant le cycle décrit ci-dessus.

Un échantillon sera entraîné dans la colonne, à raison de 0,6 ml/min/cm² de section droite. On fait passer ensuite un volume d'eau distillée égal à celui de la résine. On doit prendre garde à ne pas laisser sécher la colonne. L'effluent initial du lavage sera recueilli pour analyses ou chromatographie ultérieures. Avant la chromatographie, la colonne est lavée, habituellement, avec quelques volumes d'eau, afin d'entraîner les composés légèrement adsorbés. Cet effluent est examiné séparément.

3. L'élution.

L'appareil permettant de réaliser un gradient d'élution comporte trois éléments : un réservoir (flacon d'aspiration de 2 l), un flacon

mélangeur à fond rond (muni d'un agitateur magnétique), enfin, le tube de verre contenant la colonne de résine. Le tout est uni par un système de tuyauterie étanche à l'air.

Une pression d'air, appliquée au réservoir, fait pénétrer l'éluant, par l'orifice d'un tube de verre A, dans le flacon mélangeur, tandis que la solution contenue dans ce dernier, pénètre, sous l'effet de la pression, dans la colonne de résine, par l'orifice d'un tube B.

Le tube A se prolonge au fond du réservoir à travers un bouchon de caoutchouc et est relié au flacon mélangeur par un joint de verre. Le tube B se prolonge au centre du flacon mélangeur, à travers un bouchon de caoutchouc ou un joint de verre, et est ajusté à la colonne par l'intermédiaire d'un joint de verre.

On graisse légèrement les joints de verre et toutes les jonctions sont fermées par des ressorts, afin d'éviter les fuites d'air.

Afin de protéger la colonne du dessèchement, on lui ajoute 10 ml d'eau distillée, ce qui a, aussi, l'effet d'un second « mélangeur ». On commence l'élution avec de l'eau dans le flacon mélangeur et l'éluant concentré dans le réservoir. La concentration de l'éluant s'élève progressivement dans le mélangeur.

On peut, d'ailleurs, calculer la concentration de l'éluant d'après l'équation :

concentration de l'éluant = concentration du réservoir $\times$ (antilog $X/2,3 V$) — 1 (antilog $X/2,3 V$),

où X/V = (volume de l'éluant passé à travers la colonne) / (volume de la solution dans le flacon mélangeur).

Des variations du pouvoir éluant sont obtenues en substituant à l'éluant, dans le réservoir, une solution plus concentrée. On ne change pas le mélangeur et, ainsi, la résine n'est pas soumise à des changements brusques dans la concentration de l'éluant.

On règle, à l'aide de la pression, la vitesse de percolation de l'éluant

à environ 0,6 ml/minute/cm² de section droite. L'éluat est recueilli par un collecteur de fractions, muni d'un mécanisme de compte-gouttes.

Systèmes standards de gradient d'élution :

HURLBERT et coll. (1954) décrivent deux systèmes qui leur servent de références, mais qui peuvent être modifiés :

a) *Système acide formique* : colonne de 12 cm × 1 cm de Dowex 1 (formiate) (9,4 ml de résine) et 250 ml de volume mélangeur.

On applique quatre gradients d'élution :

- de 0 à 320 ml : acide formique 4 N,
 - de 320 à 610 ml : acide formique 4 N + formiate d'ammonium 0,2 M,
 - de 610 à 750 ml : acide formique 4 N + formiate d'ammonium 0,4 M,
 - de 750 ml à la fin de l'opération : acide formique 4 N + formiate d'ammonium 0,8 M,
- respectivement aux tubes 0, 80, 160 et 200.

Le contenu du flacon mélangeur n'est pas changé. On recueille cent gouttes par fraction (environ 5 ml au début, décroissant jusqu'à 4 ml à mesure que s'élève la concentration en acide formique) et à raison de 0,4 ml/minute.

L'absorption à 260 m μ de ce système (due à l'acide formique) est d'environ 0,2. Les volumes totaux d'éluat ainsi que les concentrations d'éluant, calculés d'après l'équation précédente, sont donnés dans le Tableau II.

b) *Système formiate d'ammonium* : colonne de 20 cm × 1 cm (15,5 ml de résine) et 500 ml de volume mélangeur.

Les trois gradients d'élution :

- de 0 à 500 ml : formiate d'ammonium 1 M
- de 500 à 1 000 ml : formiate d'ammonium 2 M
- de 1 000 ml à la fin : formiate d'ammonium 2 M
contenant acide formique 0,75 M

sont obtenus en changeant le réservoir respectivement aux tubes de 0, 100 et 200.

Le tampon de formiate d'ammonium utilisé est un mélange à peu près équimoléculaire d'acide formique et d'ammoniaque à pH 4,9 à 5,1 ; le mélange est, environ, à pH 4. On recueille 100 gouttes par fraction (environ 5 ml), à raison de 0,4 ml/minute. Les autres détails sont donnés dans le Tableau II.

L'absorption à 260 $m\mu$ de ce système est inférieure à 0,05.

TABLEAU II

Concentration des éluants dans les deux systèmes standards

N° tubes	Système acide formique			Système formiate d'ammonium	
	Eluant	HCOOH	HCOONH ₄	Eluant	HCOONH ₄
	ml	M	M	ml	M
10	50	0,74		50	0,10
20	95	1,25		100	0,18
40	175	2,0		200	0,33
60	250	2,5		300	0,45
80	320	2,9		400	0,55
100	390	3,2	0,05	500	0,63
120	465	3,4	0,09	600	0,88
160	610	3,6	0,14	800	1,26
200	750	3,8	0,25	1 000	1,50
250	925	3,9	0,50	1 250	1,70

HCOOH = acide formique HCOONH₄ = formiate d'ammonium

Ces deux systèmes peuvent subir des modifications portant, par exemple, sur la longueur de la colonne ou les gradients d'élution. KLETHI et MANDEL (1957), par exemple, utilisent des colonnes Dowex 1 X 8.

Gradients d'élution :

0 ml - 508 ml : acide formique 4 N
508 ml - 960 ml : acide formique 4 N +
formiate d'ammonium 0,2 M
960 ml - 1 280 ml : acide formique 4 N +
formiate d'ammonium 0,4 M
1 280 ml à la fin : acide formique 4 N +
formiate d'ammonium 0,8 M

4. Analyse et rechromatographie.

On mesure la densité optique des fractions des chromatogrammes à 260 $m\mu$ et 275 $m\mu$ dans les cuves de quartz de 1 cm d'un spectrophotomètre. On passe les fractions dans leur ordre de succession, afin d'éviter le plus possible la contamination d'un pic par un autre. Les lectures à 275 $m\mu$ contribuent à l'interprétation du chromatogramme, puisque les rapports des lectures $E_{275} : E_{260}$ sont caractéristiques des divers nucléotides :

Uridine : 0,6 ; Adénosine : 0,4 ; Guanosine : 0,75 ; Cytidine : 1 à 2.

La figure 2 représente un diagramme d'absorption à 260 $m\mu$, réalisé après application de ce procédé de chromatographie sur colonne sur des extraits tissulaires (MANDEL et HARTH, 1957).

Après une première chromatographie dans un système, on peut soumettre un ou plusieurs pics ainsi séparés à une seconde chromatographie dans l'autre système.

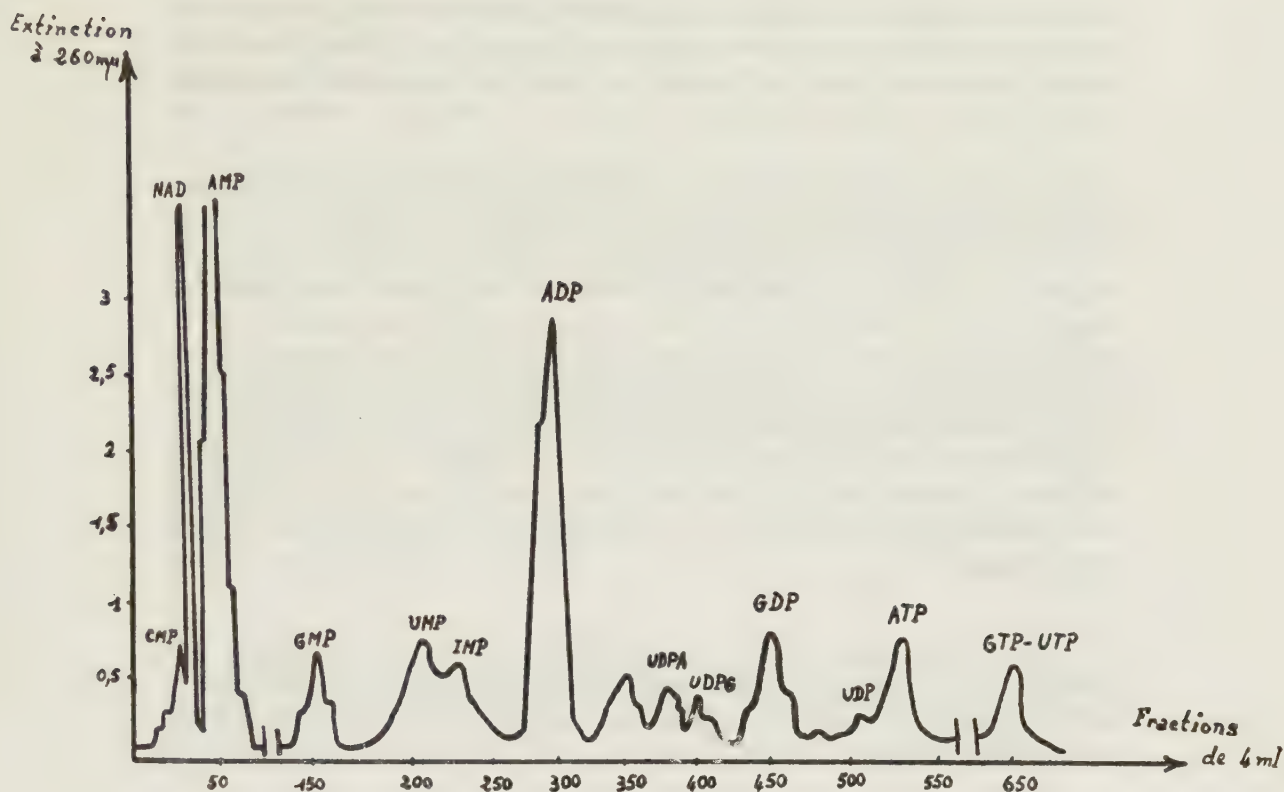


Fig. 2

Elimination de l'éluant :

Pour une analyse ou pour une chromatographie ultérieure, on réunit certaines fractions d'un pic et on les débarrasse de l'éluant. D'ordinaire, les échantillons sont séchés à la température ambiante, sous vide, pour éviter l'hydrolyse des composés labiles.

Pour des échantillons en quantité importante ou contenant beaucoup de formiate d'ammonium, on utilise la méthode de lyophilisation. Dans certains cas, on congèle d'abord les échantillons sous une faible épaisseur, dans des erlenmeyers et on les lyophilise ensuite tous ensemble dans un dessiccateur, connecté au piège d'acétone à basse température par l'intermédiaire d'une tuyauterie d'au moins 2 cm de diamètre.

Dans les deux cas, une lampe à rayonnement infra-rouge permet la dessiccation dans la dernière phase de l'opération. Celle-ci peut être rendue plus rapide par l'utilisation de verres spéciaux dans lesquels la distance entre surfaces chaudes et froides est réduite à environ 1 cm.

Pour des échantillons dont l'hydrolyse n'a pas d'importance, l'éluant est éliminé dans des dessiccateurs à vide clos, sous 1 à 20 mm de mercure et sur un mélange de soude technique - chlorure de calcium, dans le rapport 2/1 ou 3/1. On congèle ou refroidit les échantillons, avant de faire le vide, et, pendant la dessiccation, on chauffe le dessiccateur à 40° C-50° C, à l'aide d'une lampe à rayons infra-rouges. On facilite l'élimination du formiate d'ammonium en plaçant la lampe de manière que le sel puisse sublimer depuis l'échantillon chaud, jusqu'à la partie froide du dessiccateur. Si le desséchant devient trop humide ou trop chaud, le chlorure d'ammonium peut recristalliser dans l'échantillon. Si l'on ne met pas le chlorure de calcium, le dessiccateur peut s'emplir de fumées d'ammoniac.

Pour rechromatographier les échantillons, on les recueille dans une quantité d'eau suffisante pour rincer le récipient et on les neutralise à pH 6 environ. On ne les alcalinise pas, car les liaisons pyrophosphate sont labiles en milieu alcalin.

Pour effectuer l'analyse, on dissout les échantillons dans l'eau, jusqu'à l'obtention d'une concentration convenable pour les méthodes analytiques (en fait 0,5 M/ml).

Analyse des fractions en lumière ultraviolette.

On mesure la densité optique d'un volume connu de la solution, à une dilution convenable (0,20 ml dilué avec 2,00 ml) dans de l'acide chlorhydrique 0,1 N à pH 1 ou 2. Les lectures à 230, 245, 275 et 290 m μ permettent d'analyser les constituants des différents pics isolés grâce au diagramme d'absorption du chromatogramme à 260 m μ .

On note la longueur d'onde d'absorption maximale et la longueur d'onde d'absorption minimale. La solution est, ensuite, alcalinisée à pH 11, par l'addition d'un volume connu de soude N. Après quelques

minutes (qui permettent la stabilisation en milieu alcalin), on répète les lectures. Pour celles-ci, on utilise des blancs convenables d'acide chlorhydrique et de soude.

Les valeurs obtenues permettent une caractérisation des nucléotides. Par convention, on exprime tous les résultats en fractions de la lecture à la longueur d'onde d'absorption maxima en milieu acide. Les nucléotides sont ainsi identifiés d'après leur spectre d'absorption.

Pour le calcul des concentrations, on utilise les valeurs d'extinction millimolaires exprimées en densité optique (E)/micromole/ml, à la longueur d'onde d'absorption maxima et à pH 1 - 2. Ce sont les suivantes :

Uridine : 9,9 à 260 m μ	Cytidine : 13,7 à 278 m μ
Adénosine : 14,1 à 258 m μ	Guanosine : 13,3 à 256 m μ

Telle est la méthode proposée par SCHMITZ et coll. Elle permet une séparation assez complète des nucléotides, si on emploie successivement les deux systèmes, et un dosage assez précis de ces composés.

Cette méthode peut, aussi, tout en conservant le principe du gradient d'élution, subir certaines modifications techniques : ainsi LISSITZKY et coll. (1959) utilisent des colonnes de 30 cm $\times$ 2,5 cm² de Dowex 1 X 10 (formiate) 200 à 400 mesh. L'élution se fait par gradient d'acidité dans un ballon mélangeur de 1 litre :

a) acide formique 0,5 N ; b) acide formique 4 N ; c) d) e) acide formique 4 N et, respectivement, formiate d'ammonium 0,2 M, 0,4 M, et 1 M. L'ordre d'émergence de la colonne est le suivant : CMP, NAD, AMP, NADP, GMP, IMP, UMP, ADP, GPD-mannose, UDP-acétylglucosamine, UDP-hexose, GDP, UDP, ATP, GTP.

COHN et BOLLUM (1961) emploient, comme éluant, le bicarbonate d'ammonium à des concentrations progressivement croissantes.

La technique de SCHMITZ a été modifiée par MANDEL et coll. au cours de leurs études sur les nucléotides de divers tissus (KLETHI et MANDEL, 1957, puis KEMPF et MANDEL, 1961).

Ainsi, les fractions isolées à l'aide d'une première chromatographie sur colonne Dowex 1 $\times$ 8 dans le système « acide formique » de SCHMITZ, sont reprises pour être soumises à une rechromatographie sur papier Whatman N° 3, avec les solvants suivants :

A (n - propanol - ammoniacque concentré - eau : 60/10/30) pour l'identification des bases.

B (acide acétique 0,02 N dans l'éthanol 60 %) et

C (tampon Tris - acide chlorhydrique 0,25 N à pH 8 dans l'éthanol 50 %), en chromatographie bidimensionnelle (méthode de E.P. KENNEDY, 1956), pour la mise en évidence de la CDP-choline et de la CDP-éthanolamine.

D (phénol - eau : 63/35) et

E (n - butanol - acide acétique - eau : 52/13/35) pour la mise en évidence du GDP-galactose et du GDP-mannose (SU et HASSID, 1960).

F (éthanol 95° - acétate d'ammonium 1 M à pH 7,5 : 75/30), solvant de PALADINI et LELOIR (1952), pour la séparation des UDP-coenzyme, UDP-acétylglucosamine, UDP-glucose et UDP-galactose.

G (acétate d'éthyle, pyridine, eau : 20/10/20) pour l'UDP-coenzyme.

On peut également, par cette technique, mettre en évidence la N-acétylglucosamine, par la méthode d'AMINOFF (1952), modifiée par REISSIG, STROMENGER et LELOIR (1955), qui consiste à chauffer au bain-marie, pendant 3 minutes, 0,5 ml d'échantillon additionné de 0,1 ml de tétraborate de potassium (0,8 M ; pH 9,1) et à ajouter, après refroidissement, 3 ml paradiméthylaminobenzaldéhyde (10 g dissous dans 100 ml d'acide acétique glacial, contenant 12,5 % d'acide chlorhydrique 10 N ; dilué avant usage par 9 volumes d'acide acétique glacial). Les tubes, après avoir été placés pendant 20 minutes dans un bain à 38° C, sont refroidis dans de l'eau glacée et la mesure spectrophotométrique est effectuée immédiatement à 585 m μ .

VI. — LA CHROMATOGRAPHIE BIDIMENSIONNELLE SUR PAPIER

Depuis 1944, la chromatographie de partage sur papier a pris une extension considérable. Elle présente, en effet, l'intérêt d'être une méthode simple et sensible. Elle consiste à faire migrer, sous l'influence d'un solvant déterminé, le mélange complexe à analyser sur une feuille de papier. Les divers composants du mélange migrent avec des vitesses différentes, ce qui permet de les séparer. On peut pratiquer une chromatographie ascendante ou descendante.

De nombreux travaux ont été réalisés, mettant en œuvre cette technique, pour l'isolement des différents nucléotides : EGGLESTON et HEMS (1952) ; KREBS et HEMS (1953) ; TSUBOI et PRICE (1959) ; LEDERER (1960).

Cependant, la chromatographie en une seule dimension, quel que soit le solvant, sépare mal les différents nucléotides acidosolubles extraits des tissus animaux. Pour une séparation plus complète sur papier, la chromatographie bidimensionnelle est nécessaire. Elle consiste à pratiquer une première chromatographie dans une certaine direction, sous l'influence d'un premier solvant, puis, après séchage du chromatogramme obtenu, à faire subir aux composés ainsi séparés une seconde migration, dans la direction perpendiculaire à la première, avec un solvant différent du premier.

Le choix judicieux des solvants permet d'isoler, au terme de la seconde opération, les éléments qui n'ont pu être séparés la première fois.

Telle est la méthode que nous avons utilisée, au cours de ce travail, et que nous allons, maintenant, exposer en détail.

Nous devons, cependant, signaler que l'analyse chromatographique sur papier ne peut être effectuée de façon convenable sans une séparation et une purification préalable du milieu à analyser. A cet effet, il est nécessaire d'adsorber préalablement les nucléotides sur une colonne de charbon activé.

1. Adsorption des nucléotides par passage sur une colonne de charbon activé.

Les nucléotides d'une quantité connue d'extrait tissulaire, dont nous étudierons la préparation au chapitre « Résultats », sont adsorbés sur une colonne de 2 mm de diamètre interne, chargée d'un mélange à poids égaux de charbon actif (Norit SX 30 spécial) et de « Hyflow supercell », adjuvant de percolation.

Avant le passage de l'extrait, la colonne est traitée par 2 ml d'une solution d'acide éthylène-diamine-tétracétique (Versène) à 2 % neutralisée, qui empêche l'adsorption, partiellement irréversible, des di- et triphosphates, puis lavée par 1 ml d'eau et, enfin, désactivée par passage de 5 ml d'une solution d'octanol à 8 % dans l'éthanol.

Après passage d'un volume connu de l'extrait, on lave la colonne avec 1 ml d'eau distillée, puis on élue les nucléotides par 6 ml de pyridine à 50 %. Toutes ces opérations se font sous pression de 1 atmosphère. L'ensemble de ces techniques a été décrit par VOLFIN, CLAUSER, GAUTHERON et EBOUE (1961).

L'éluat est recueilli et évaporé à sec sous un courant d'air froid. Le cristal pyridine-nucléotides obtenu peut, alors, être conservé, sans inconvénient, à — 20° C pendant plusieurs semaines. Pour réaliser la chromatographie, on reprendra le cristal pyridine-nucléotides dans 0,5 ml d'eau ou 0,5 ml de pyridine.

2. Préparation du papier.

Les feuilles de papier Whatman N° 1 (46 x 46 cm) sont traitées pendant 6 heures dans un bac, à l'aide d'une solution de versène à 0,2 % préparée extemporanément à partir d'une solution stock à 2 % neutralisée à pH 7 avec de l'ammoniaque N. On pratique, ensuite, 6 lavages à l'eau distillée. On fait, finalement, sécher le papier sur une surface polie et propre.

Selon EGGLESTON et HEMS (1952), ce traitement du papier par le versène (qui élimine les impuretés métalliques) rend les spots de chromatographie plus compacts et supprime les trainées qui pourraient gêner la résolution chromatographique.

3. Chromatographie.

a) *Dépôts* : les dépôts sont effectués, à l'aide d'une seringue micro-métrique « Agla » (Burroughs Wellcome and Co), par fractions de $10 \mu\text{l}$,

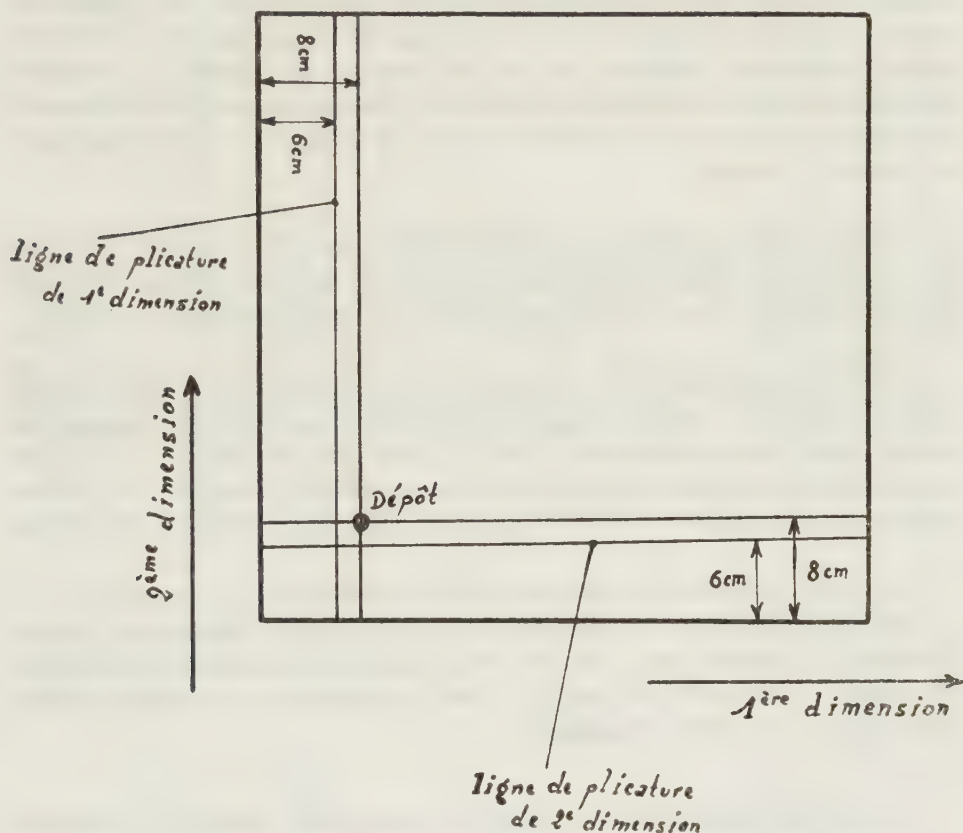


Fig. 3

Préparation de la feuille de papier à chromatographie

à l'intersection de deux lignes perpendiculaires tracées à 8 cm de deux bords de la feuille, comme le montre la figure 3. Entre chaque dépôt de

10 μ l, les taches sont séchées par un courant d'air froid, en prenant soin d'éviter toute élévation de température.

A la fin de l'opération, on plie le papier suivant une ligne tracée à 6 cm du bord de la feuille, c'est-à-dire à 2 cm d'une des deux lignes précédemment tracées (figure 3).

b) *Matériel* : les chromatographies sont réalisées dans des cuves de verre à faces parallèles, type Shandon, de 50 cm de haut et d'une surface de base de 50 x 22 cm, fermées en haut par une plaque de verre rodée. Le châssis de la cuve supporte deux augettes de verre semi-cylindriques d'environ 48 cm de longueur et capables de contenir 100 ml de solvant. De part et d'autre de chacune des augettes est posée une baguette de verre d'environ 49 cm de longueur et qui servira à supporter le papier.

Avant toute opération, on doit prendre soin de disposer, au fond de la cuve, de petits récipients contenant le solvant utilisé. On laisse l'atmosphère se saturer en vapeurs de ce solvant pendant 24 heures.

Après avoir effectué les dépôts, on place la feuille de papier sur la baguette de verre selon la ligne de plicature et de telle façon que l'un des bords se trouve maintenu dans l'augette par une baguette de verre. Après 60 à 90 minutes d'équilibration, on remplit l'augette du solvant approprié et on laisse le développement s'effectuer pendant 24 heures.

(On doit signaler qu'une précaution essentielle doit être prise : la feuille de papier doit être disposée d'une façon rigoureusement perpendiculaire au bord de l'augette, afin de permettre une migration régulière sur toute la surface de la feuille. Cette précaution est également nécessaire pour la seconde dimension).

Le développement de la première dimension terminé, le chromatogramme est, alors, retiré de la cuve et séché sous une sorbonne ventilée. Les nucléotides sont révélés à l'aide d'une lampe à rayons ultra-violet (lampe mineral-light short waves, 258 m μ). On localise les spots objectivés par les rayons ultra-violet en les entourant d'un trait de crayon.

Le papier est, ensuite, plié selon la ligne de plicature de seconde dimension. Il est placé dans une deuxième cuve, saturée, au préalable, en solvant de deuxième dimension et une seconde chromatographie descendante est pratiquée. Le développement se poursuit pendant 48 heures. Le papier est, ensuite, séché comme décrit ci-dessus et les nucléotides sont, de nouveau, révélés en lumière ultra-violette à 258 m μ .

c) *Solvants utilisés* : pour la chromatographie en première dimension, on utilise le solvant de KREBS et HEMS (1953) :

(acide isobutyrique 10 volumes, ammoniac N 6 volumes).

Pour la seconde dimension, le solvant N° 5 de TSUBOI et PRICE (1959) :

(n-propanol 6 volumes, eau distillée 1 volume, ammoniac concentré 3 volumes).

Afin d'isoler les nucléotides des différents tissus, nous avons, tout d'abord, établi des « cartes » de chromatographie dans les deux systèmes solvants, avec des solutions standards de nucléotides. Les résultats sont représentés sur les figures N° 4 à 6. Les R_f relatifs, mesurés par rapport à celui de l'AMP, sont donnés dans le Tableau III où ils peuvent être comparés aux valeurs données par KREBS et HEMS (1953) et à celles de VOLFIN et coll. (1961).

TABLEAU III

Nucléotides	Rf relatifs à celui de l'AMP			
	Solvant 1 ^{re} dimension			Solvant 2 ^e dimension
	KREBS et HEMS	VOLFIN et coll.	Résultats personnels	Résultats personnels
AMP	1,00	1,00	1,00	1,00
ADP	0,80	0,82	0,80 - 0,84	0,73
ATP	0,66	0,65	0,65 - 0,73	0,55
NAD		0,87	0,87 - 0,92	*
NADP		0,58	0,70	0,65
GMP		0,54	0,54	0,54
GDP		0,41	0,42	0,35
GTP		0,27	0,28 - 0,30	0,26
CMP			0,85	0,81
CDP		0,62	0,67	0,62
CTP		0,46	0,56	0,47
UMP			0,58	0,79
UDP		0,40	0,44	0,51
UTP		0,27	0,33	0,38
IMP	0,53	0,57	0,59	0,75
IDP	0,39		0,46	0,52
ITP	0,26		0,37	0,37

* En 2^e dimension, le NAD est entraîné avec le solvant.

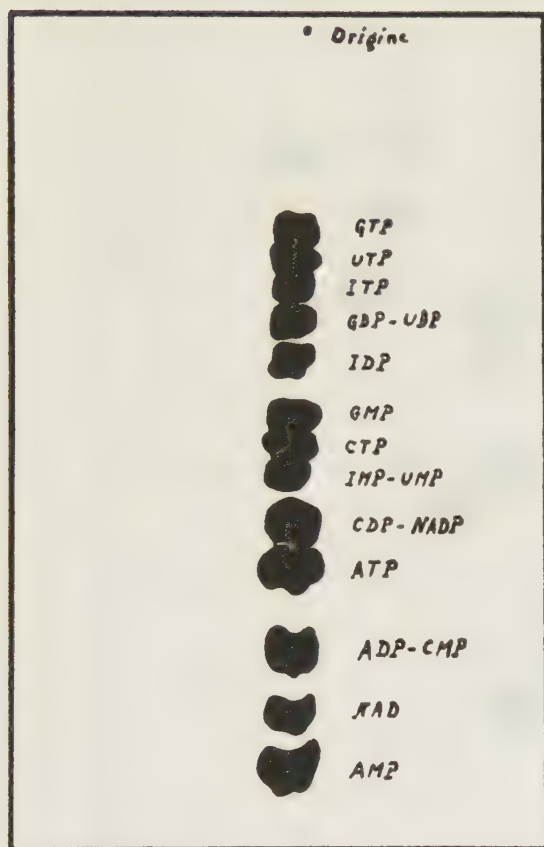


Fig. 4

Chromatographie sur papier des
nucléotides à l'aide du solvant de
1^{re} dimension

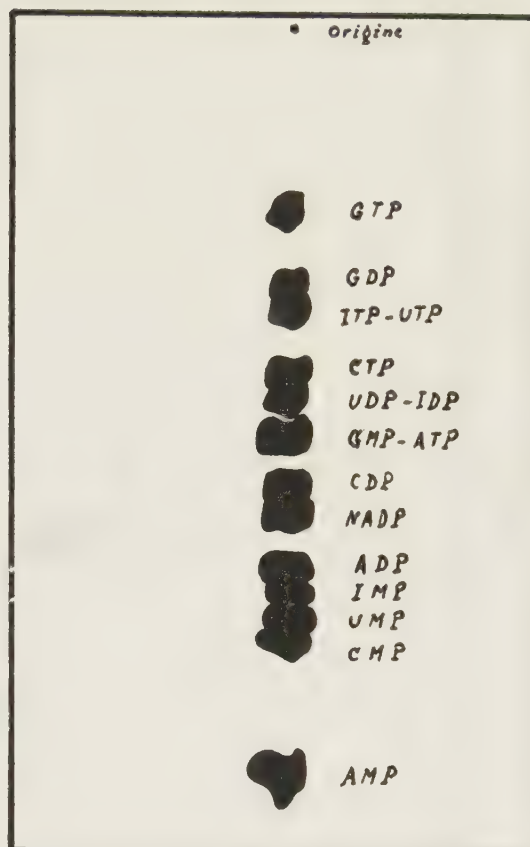


Fig. 5

Chromatographie sur papier des
nucléotides à l'aide du solvant de
2^e dimension

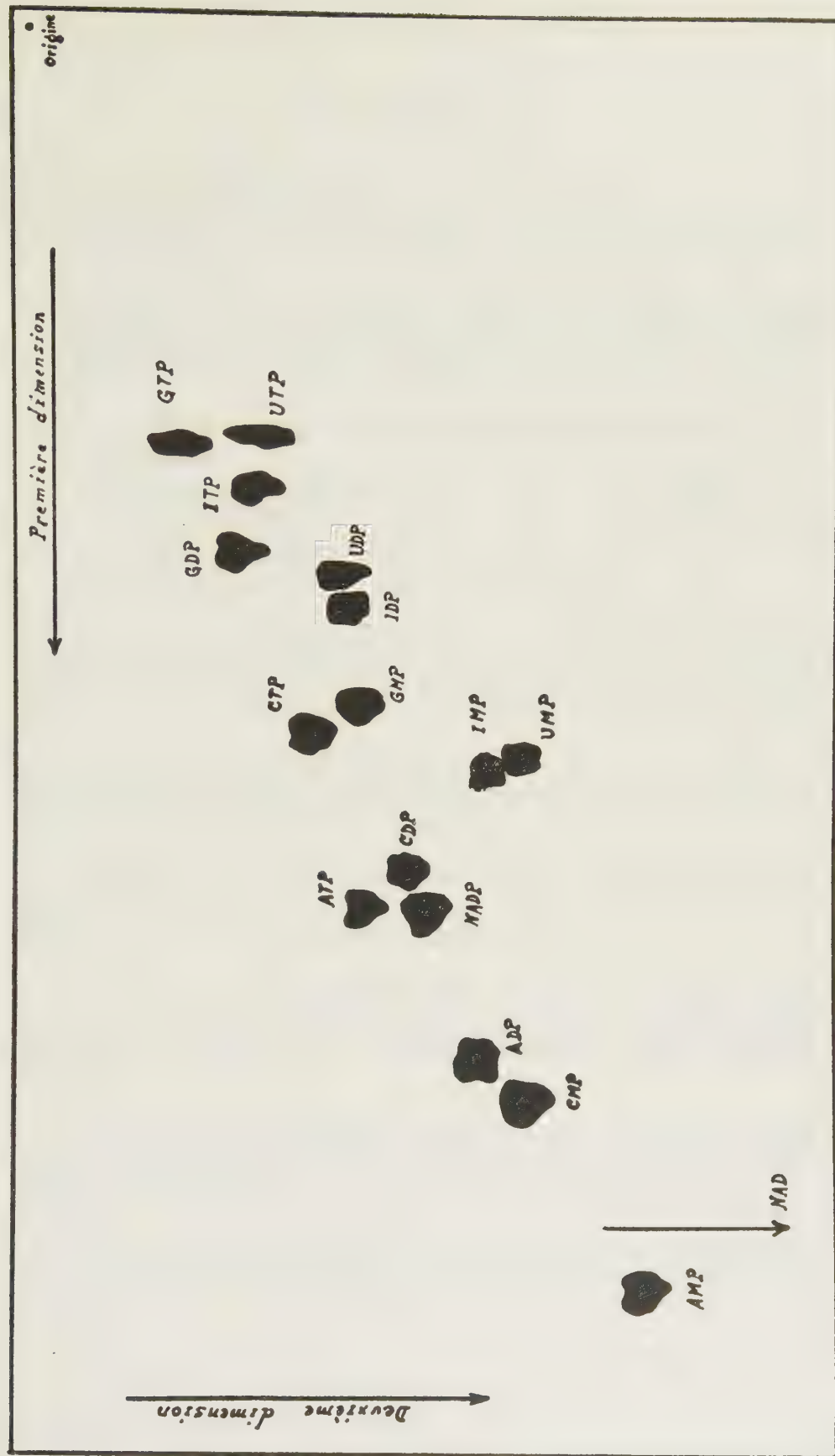


Fig. 6
Chromatographie bidimensionnelle des nucléotides

4. Dosage des nucléotides.

Les nucléotides acidosolubles isolés par chromatographie sont dosés d'après leur teneur en phosphate, selon le protocole suivant :

a) *Minéralisation* : les spots sont découpés sur le papier, en ayant soin d'éviter tout contact avec les doigts en cours de manipulation, puis placés dans un matras. On ajoute successivement :

— 0,5 ml du mélange minéralisant de HANES et ISHERWOOD (1949), c'est-à-dire :

acide sulfurique concentré	3 volumes
acide perchlorique 60 %	2 volumes

— 0,3 ml de molybdate d'ammonium 2,5 % (dans l'eau).

Le molybdate catalyse, en effet, la minéralisation.

On chauffe très doucement, au début, en raison de l'action catalytique du molybdate d'ammonium, puis plus fort, jusqu'à ce que l'on note, à la fin de la minéralisation, l'apparition d'une coloration jaune.

b) *Dosage selon la technique de Berenblum et Chain (1938)* : on laisse refroidir le matras après minéralisation, puis on transfère le minéralisat dans une ampoule à décanter.

On rince le matras à trois reprises, une fois avec 3 ml d'eau, puis deux fois avec 2 ml d'eau, soit 7 ml au total. Les liquides de rinçage sont transvasés dans l'ampoule à décantation.

On ajoute 2,5 ml de molybdate d'ammonium 2,5 % (dans l'eau) et 8 ml d'isobutanol bidistillé. On pratique une extraction pendant 30 secondes, en agitant les ampoules. On élimine la phase aqueuse, inférieure.

On fait ensuite deux lavages, chaque fois avec 5 ml d'acide sulfurique N. On agite, à cet effet, durant 15 secondes, en soutirant chaque fois la phase inférieure.

Enfin, l'extrait isobutanolique est entraîné dans un tube gradué. On lave l'ampoule et on ajuste à 10 ml avec de l'éthanol à 95°.

On fait un blanc en introduisant, dans une ampoule à décanner, 6,5 ml d'eau, en présence de 0,5 ml du mélange minéralisant afin d'obtenir un pH acide.

On prépare un standard à 10 μg de phosphore par ml, par dilution d'une solution mère de phosphate monopotassique (KH_2PO_4) à 0,4389 g/l (100 μg de phosphore par ml). On utilise 1 ml de standard à 10 μg , acidifié, dans une ampoule à décantation, par 0,5 ml du mélange minéralisant et auquel on ajoute 6 ml d'eau.

Un blanc-papier sera aussi préparé, à partir du chromatogramme, pour soustraire des valeurs obtenues le phosphore contenu dans le papier.

Pour la lecture, on ajoute, dans chaque tube gradué, 0,10 ml d'une solution de chlorure stanneux à 40 % (10 g dans 25 ml d'acide chlorhydrique pur). On agite, puis on lit immédiatement au photomètre, à 680 $\text{m}\mu$.

Les résultats de nos expérimentations, obtenus par ces méthodes d'isolement et de dosage des nucléotides, sont donnés dans le chapitre III. Notons que le rendement de ces méthodes, calculé avec des extraits connus de différents nucléotides, est compris entre 90 et 100 %.

CHAPITRE III

RESULTATS

- I. Généralités.
- II. Nucléotides libres du tissu hépatique.
- III. Nucléotides libres du cerveau.
- IV. Nucléotides libres du tissu myocardique.

I. — GENERALITES

La méthode précédemment décrite nous a permis d'étudier la répartition des nucléotides acidosolubles dans divers organes, d'une part chez le lapin normal et, d'autre part, chez le lapin soumis à un régime athérosclérogène.

Les animaux utilisés, des lapins de race commune, d'un poids moyen de 3 kg, ont été divisés en deux lots. Les résultats des analyses effectuées sur le premier lot nous ont fourni les valeurs témoins. Les animaux du second lot ont été soumis à un régime alimentaire contenant 1 % de cholestérol, 3 % d'huile d'olive et 10 % de caséine, pendant 1, 2 ou 3 mois.

Nous avons dosé les nucléotides libres du tissu hépatique, du cerveau et du tissu myocardique de ces animaux. Les résultats sont groupés, pour chaque organe et en fonction de la durée du régime athérosclérogène, dans les tableaux ci-après (tissu hépatique : tableaux IV à IX ; cerveau : tableaux X à XVII ; myocarde : tableaux XVIII à XXV). Notre étude étant plus particulièrement centrée sur les nucléotides adényliques, nous avons séparé ces derniers, dans nos tableaux, des autres nucléotides libres.

Ces résultats sont exprimés en microgrammes de phosphore par gramme de poids frais ($\mu\text{gP/gpf}$). Pour les nucléotides adényliques, les moyennes sont suivies de l'erreur-type. Nous avons, par ailleurs, calculé, pour chacun de ces composés, la correspondance en micromoles pour cent grammes de poids frais ($\mu\text{M}/100 \text{ gpf}$).

Les conditions de prélèvement sont précisées pour chaque organe. Un point particulier mérite d'être discuté :

Les tissus à analyser sont prélevés dès la mort de l'animal, puis pesés dans un récipient refroidi.

Différents auteurs (MANDEL, en particulier) soumettent les tissus prélevés à une congélation préalable. Nous n'avons pas procédé de la même façon ; en effet, VOLFIN, CLAUSER, GAUTHERON et EBOUE (1961) ont montré que cette méthode de congélation-décongélation entraînait certaines modifications au niveau des nucléotides des tissus ainsi traités et qu'en particulier les liaisons Phosphore-Phosphore pouvaient être rompues. On aurait, alors, une diminution du taux d'ATP, par exemple, au profit du taux d'AMP.

Par ailleurs, pour le prélèvement des tissus cérébraux, STONE (1940), DORING et GERLACH (1957) et d'autres auteurs ont pensé que la décapitation entraînait, au moment du sacrifice, une chute de l'ATP. Ils ont essayé de pallier cet inconvénient en sacrifiant les animaux sous anesthésie. Mais STONE (1940), en particulier, a montré que celle-ci produisait une accumulation d'ATP par manque d'utilisation. D'autre part, COPER et coll. (1954) estiment avoir obtenu de bons résultats sans anesthésie.

MANDEL et WEILL (1962), travaillant sur des rats, emploient la méthode de décapitation sous anesthésie, suivie de la congélation dans l'azote liquide de la tête entière, dont le cerveau est disséqué à l'état congelé dans un meuble réfrigéré. Mais, outre le fait que nous avons évité de pratiquer cette congélation pour les raisons ci-dessus énoncées, il est évident que, pour de gros animaux comme le lapin, la congélation de la tête poserait beaucoup plus de problèmes que pour de petits animaux tels que le rat.

De plus, la durée de congélation, plus longue chez les gros animaux, supprimerait, en grande partie, l'avantage que nous aurions pu retirer

en l'utilisant (MANDEL et WEILL (1962) l'ont, d'ailleurs, signalé). Enfin, le taux d'ATP, que MANDEL et WEILL prennent comme référence dans la comparaison des différentes techniques, est, à peu près, comparable dans nos résultats et dans les leurs ; de plus, le NAD, sensible aux phénomènes de dégradation, qui ne se trouve qu'à l'état de traces dans les expériences rapportées par MANDEL et coll., est retrouvé en quantité appréciable, comme le montrent nos résultats.

C'est pourquoi nous nous sommes bornés à décapiter simplement les animaux, sans anesthésie, et, après ouverture rapide de la boîte crânienne, à prélever de la substance cérébrale.

II. — NUCLEOTIDES LIBRES DU TISSU HEPATIQUE

CONDITIONS DE PRELEVEMENT

Les animaux sont sacrifiés par fracture de la colonne cervicale et saignés. Après ouverture rapide de la cage thoracique par section du sternum, suivie d'une section médiane de la paroi abdominale, le foie est prélevé, puis lavé dans du sérum physiologique refroidi. On prélève rapidement 2 g de tissu que l'on soumet au traitement ci-après.

Le tissu est broyé dans un homogénéiseur type « Biorex » refroidi à 0° C, en présence d'acide trichloracétique à 10 % (5 ml/g de tissu). L'homogénat est centrifugé à 0° C, à 25 000 × g pendant 15 minutes.

Le surnageant est traité quatre fois, chaque fois avec un volume d'éther éthylique refroidi, afin d'éliminer l'acide trichloracétique. La phase supérieure étherée est décantée chaque fois par aspiration et, après la dernière extraction, on évapore l'excès d'éther sous un courant gazeux (air comprimé) pendant 10 minutes, l'extrait étant maintenu à 0° C.

Il est, parfois, nécessaire de filtrer l'extrait, afin de le rendre parfaitement limpide.

Pour la chromatographie et après avoir effectué des essais préliminaires en vue de définir la concentration optimum, nous avons déposé, sur les chromatogrammes, 100 microlitres de la solution aqueuse obtenue à partir du cristal pyridine-nucléotides. Ces dépôts sont effectués par fractions de 10 microlitres, à l'aide d'une seringue micrométrique « Agla » (Burroughs Wellcome and Co).

RESULTATS

Nous constatons que le tissu hépatique est très riche en nucléotides adényliques (environ 80 % du phosphore total des nucléotides libres). Par ordre d'importance décroissante, nous relevons l'AMP, l'ADP, l'ATP et le NAD.

Au cours du régime athérosclérogène, le taux d'ATP diminue de façon significative dès la fin du premier mois et continue à baisser au cours des deuxième et troisième mois (70 % de la valeur normale à la fin de celui-ci). Le taux d'ADP subit une évolution du même genre, mais de façon un peu moins nette (80 % de la valeur normale, au troisième mois), cependant que la quantité d'AMP varie assez peu et que le NAD commence à diminuer seulement à la fin du troisième mois.

Le rapport ATP/ADP, égal à 0,98 chez les animaux témoins, varie faiblement (jusqu'à 0,80) au cours du traitement.

Outre ces nucléotides adényliques, nous avons noté la présence d'IMP, de CTP, de GMP, de GDP, de GTP et d'UTP. On observe, vers la fin du troisième mois de régime, une augmentation assez nette du taux d'IMP, contrastant avec une baisse de la quantité des nucléotides guanyliques et uridyliques.

TABLEAU IV

NUCLEOTIDES ADENYLIQUES DU TISSU HEPATIQUE

LAPINS NORMAUX

		ATP	ADP	AMP	NAD
Animaux d'expérience - Résultats en $\mu\text{gP/gpf.}$	1	160	86	28	58
	2	175	86	32	53
	3	104	82	42	53
	4	159	96	54	74
	5	90	77	54	61
	6	108	99	47	75
	7	147	123	69	47
	8	112	81	51	43
	9	117	90	69	45
	10	158	123	69	84
	11	117	90	69	45
	12	176	104	51	53
	13	171	93	61	46
$\bar{X} \pm \text{sm } (\mu\text{gP/gpf.})$		$138,0 \pm 8,5$	$94,6 \pm 4,0$	$53,5 \pm 4,2$	$56,7 \pm 3,7$
$\mu\text{M}/100 \text{ gpf.}$		154	157	178	94

TABLEAU V

NUCLEOTIDES ADENYLIQUES DU TISSU HEPATIQUE

LAPINS APRES 1 MOIS DE REGIME

		ATP	ADP	AMP	NAD
Animaux d'expérience Résultats en $\mu\text{gP/gpf.}$	1	98	87	37	60
	2	135	78	59	35
	3	108	85	59	42
	4	123	93	85	54
	5	100	83	71	42
	6	87	72	59	48
	7	97	51	43	46
	8	81	87	45	37
	9	100	162	104	150
	10	152	107	44	60
	11	83	62	83	41
$\bar{X} \pm \text{sm } (\mu\text{gP/gpf.})$		$\begin{matrix} 105,8 \\ \pm 7,2 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 87,9 \\ \pm 9,2 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 62,6 \\ \pm 6,7 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 55,9 \\ \pm 10,4 \end{matrix}$
$\mu\text{M}/100 \text{ gpf.}$		118	146	216	93

TABLEAU VI

NUCLEOTIDES ADENYLIQUES DU TISSU HEPATIQUE

LAPINS APRES 2 MOIS DE REGIME

		ATP	ADP	AMP	NAD
Animaux Résultats en $\mu\text{gP/gpf.}$	1	111	73	21	91
	2	114	94	24	64
	3	101	72	44	49
	4	91	76	54	49
$\bar{X} \pm \text{sm } (\mu\text{gP/gpf.})$		$104,2 \pm 5,2$	$78,8 \pm 5,2$	$35,8 \pm 7,9$	$63,3 \pm 9,9$
$\mu\text{M}/100 \text{ gpf.}$		116	131	119	105

TABLEAU VII

NUCLEOTIDES ADENYLIQUES DU TISSU HEPATIQUE

LAPINS APRES 3 MOIS DE REGIME

		ATP	ADP	AMP	NAD
Animaux d'expérience - Résultats en $\mu\text{gP/gpf.}$	1	100	70	58	53
	2	119	100	100	48
	3	114	83	68	54
	4	91	125	63	57
	5	82	60	55	47
	6	84	56	49	47
	7	80	62	41	36
	8	95	81	42	42
	9	83	68	45	45
	10	106	59	54	43
	11	98	73	58	50
	12	102	65	52	42
	13	97	73	48	39
	14	88	72	50	45
$\bar{X} \pm \text{sm } (\mu\text{gP/gpf.})$		95,6 $\pm 4,8$	74,7 $\pm 4,9$	55,9 $\pm 3,9$	46,2 $\pm 1,6$
$\mu\text{M}/100 \text{ gpf.}$		106	124	186	77

TABLEAU VIII

NUCLEOTIDES NON ADENYLIQUES DU TISSU HEPATIQUE

LAPINS NORMAUX

		IMP	CTP	GTP	GDP	GMP	UTP
Animaux d'expérience - Résultats en $\mu\text{gP/gpf.}$	1	12	9	12	8	9	12
	2	14	8	14	10	10	12
	3	12	7	10	6	12	14
	4	15	9	15	10	10	20
	5	19	12	17	5	11	12
	6	17	10	12	12	15	18
	7	16	12	10	13	10	22
	8	14	12	15	14	12	18
	9	13	13	12	10	12	19
	10	15	14	12	10	10	12
	11	18	10	14	12	11	17
	12	14	14	15	10	10	15
	13	13	12	11	12	9	14
Moyennes en $\mu\text{gP/gpf.}$		14,8	10,9	13,0	10,1	10,8	15,7
$\mu\text{M}/100 \text{ gpf.}$		49	12	14	17	36	17

TABLEAU IX

NUCLEOTIDES NON ADENYLIQUES DU TISSU HEPATIQUE

LAPINS APRES 3 MOIS DE REGIME

		IMP	CTP	GTP	GDP	GMP	UTP
Animaux d'expérience Résultats en $\mu\text{gP/gpf.}$	1	23	10	12	12	9	10
	2	26	9	5	17	5	7
	3	25	12	9	15	10	16
	4	23	11	7	8	7	12
	5	26	13	6	5	12	10
	6	25	12	5	9	9	9
	7	23	10	9	10	12	12
	8	21	14	10	15	8	10
	9	20	10	12	9	7	10
Moyennes en $\mu\text{gP/gpf.}$		23,5	11,2	8,3	11,1	7,6	10,6
$\mu\text{M/100 gpf.}$		77	12	9	18	25	12

III. — NUCLEOTIDES LIBRES DU CERVEAU

CONDITIONS DE PRELEVEMENT

Les animaux sont sacrifiés par décapitation, afin d'éviter toute infiltration sanguine de la masse cérébrale. Après ouverture de la boîte crânienne par section postérieure puis bilatérale des os du crâne, le cerveau apparaît à nu. On prélève 2 g de tissu cérébral et l'échantillon est traité selon la technique exposée précédemment.

Comme pour le tissu hépatique, il est nécessaire de filtrer l'extrait obtenu après traitement par l'éther.

RESULTATS

Dans ce tissu, on peut également noter une grande richesse en nucléotides adényliques (environ 70 à 75 % de la quantité totale de phosphore des nucléotides libres). Ces nucléotides sont, cependant, en moins grande quantité que dans le tissu hépatique (le rapport des deux sommes, en micromoles, est de 42 %). L'ATP est, relativement, le composé le plus important. Puis, par ordre décroissant, l'AMP, l'ADP et le NAD.

Au cours de l'athérosclérose expérimentale, on constate une augmentation du taux d'ATP pendant le deuxième mois de régime, puis un retour à la valeur normale à la fin du troisième mois.

L'AMP suit une évolution parallèle. Le taux d'ADP augmente au cours des deux premiers mois et se stabilise ensuite.

En ce qui concerne le NAD, on note une évolution parallèle à celles de l'ATP et de l'AMP.

Le rapport ATP/ADP baisse régulièrement pendant toute la durée du régime. D'une valeur de 2,60 chez les animaux témoins, il tombe à 2, puis à 1,80 respectivement aux deuxième et troisième mois.

A la fin du troisième mois, le taux d'ADP a augmenté de 40 % par rapport à la valeur normale, assez faible, cependant que les taux des autres nucléotides restent inchangés. La quantité totale de nucléotides adényliques a augmenté de façon peu sensible (environ 5 %) et non significative.

Pour les nucléotides non adényliques, nous constatons la présence d'IMP, de CTP, de GTP, de GDP et d'UTP.

L'IMP et le CTP subissent une augmentation assez sensible, au cours du régime, tandis que les valeurs des autres nucléotides libres restent à peu près stationnaires.

TABLEAU X

NUCLEOTIDES ADENYLIQUES DU CERVEAU

LAPINS NORMAUX

		ATP	ADP	AMP	NAD
Animaux d'expérience - Résultats en $\mu\text{gP/gpf.}$	1	84	24	29	18
	2	84	21	22	19
	3	80	23	33	21
	4	83	21	25	20
	5	89	21	22	19
	6	91	15	15	17
	7	93	20	21	20
	8	87	22	25	25
	9	80	19	26	22
	10	75	28	28	17
	11	83	30	30	23
	12	83	25	27	21
	13	73	17	25	22
	14	80	22	26	21
$\bar{X} \pm \text{sm } (\mu\text{gP/gpf.})$		$83,2 \pm 1,7$	$22 \pm 1,0$	$26 \pm 1,4$	$20,3 \pm 0,6$
$\mu\text{M}/100 \text{ gpf.}$		92	36	86	34

TABLEAU XI

NUCLEOTIDES ADENYLIQUES DU CERVEAU

LAPINS APRES 1 MOIS DE REGIME

		ATP	ADP	AMP	NAD
Animaux d'expérience Résultats en $\mu\text{gP/gpf.}$	1	85	22	19	13
	2	87	17	19	16
	3	92	28	30	17
	4	91	22	26	18
	5	88	26	27	15
	6	84	19	28	22
	7	89	28	29	23
	8	87	23	33	22
	9	71	24	33	22
	10	76	25	35	21
$\bar{X} \pm \text{sm } (\mu\text{gP/gpf.})$		$\begin{matrix} 85 \\ \pm 2,1 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 23,4 \\ \pm 1,1 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 27,9 \\ \pm 1,7 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 18,9 \\ \pm 1,1 \end{matrix}$
$\mu\text{M}/100 \text{ gpf.}$		94	39	93	32

TABLEAU XII

NUCLEOTIDES ADENYLIQUES DU CERVEAU

LAPINS APRES 2 MOIS DE REGIME

		ATP	ADP	AMP	NAD
Animaux d'expérience Résultats en $\mu\text{gP/gpf.}$	1	95	25	25	25
	2	97	37	32	30
	3	92	32	36	26
	4	100	31	41	30
	5	98	40	33	27
	6	82	38	34	33
	7	97	17	37	26
	8	84	30	24	30
$\bar{X} \pm \text{sm } (\mu\text{gP/gpf.})$		$93,2 \pm 1,5$	$31,2 \pm 1,8$	$32,7 \pm 2,0$	$28,3 \pm 0,9$
$\mu\text{M}/100 \text{ gpf.}$		103	52	109	47

TABLEAU XIII

NUCLEOTIDES ADENYLIQUES DU CERVEAU

LAPINS APRES 3 MOIS DE REGIME

		ATP	ADP	AMP	NAD
Animaux d'expérience Résultats en $\mu\text{gP/gpf.}$	1	91	40	27	20
	2	75	26	28	28
	3	91	28	12	21
	4	78	36	31	19
	5	83	35	21	29
	6	85	35	24	25
	7	79	27	23	14
	8	88	25	29	22
	9	83	21	14	16
$\bar{X} \pm \text{sm } (\mu\text{gP/gpf.})$		$83,7 \pm 1,9$	$31,4 \pm 2,2$	$23,2 \pm 2,2$	$21,5 \pm 1,7$
$\mu\text{M}/100 \text{ gpf.}$		93	52	77	36

TABLEAU XIV

NUCLEOTIDES NON ADENYLIQUES DU CERVEAU

LAPINS NORMAUX

		IMP	CTP	GTP	GDP	UTP
Animaux d'expérience - Résultats en $\mu\text{gP/gpf.}$	1	10	9	16	10	8
	2	10	9	12	15	8
	3	8	10	16	12	9
	4	7	10	13	15	13
	5	8	11	14	7	12
	6	7	10	15	14	10
	7	9	11	15	8	13
	8	7	8	12	13	10
	9	10	15	14	10	8
	10	8	11	12	15	12
	11	8	12	14	14	8
	12	8	12	17	15	10
	13	7	13	16	12	8
	14	7	8	14	16	12
Moyennes en $\mu\text{gP/gpf.}$		8,1	10,6	14,2	12,5	10,0
$\mu\text{M}/100 \text{ gpf.}$		27	12	16	21	11

TABLEAU XV

NUCLEOTIDES NON ADENYLIQUES DU CERVEAU

LAPINS APRES 1 MOIS DE REGIME

	IMP	CTP	GTP	GDP	UTP
1	7	12	15	7	8
2	5	7	12	10	9
3	8	10	10	9	9
4	10	11	10	12	9
5	7	12	13	11	12
6	8	13	13	12	12
7	6	8	14	12	10
8	7	9	11	11	8
9	7	12	13	11	12
10	10	14	13	13	14
Moyennes en $\mu\text{gP/gpf.}$	7,5	10,8	12,4	10,8	10,3
$\mu\text{M/100 gpf.}$	25	12	14	18	11

TABLEAU XVI

NUCLEOTIDES NON ADENYLIQUES DU CERVEAU

LAPINS APRES 2 MOIS DE REGIME

	IMP	CTP	GTP	GDP	UTP
1	7	12	12	12	10
2	8	13	12	13	9
3	6	10	15	14	12
4	9	11	14	15	10
5	7	12	13	13	13
6	10	10	20	11	14
7	8	13	13	10	10
8	9	9	17	9	15
Animaux d'expérience Résultats en $\mu\text{gP/gpf.}$					
Moyennes en $\mu\text{gP/gpf.}$	8,0	11,2	14,5	12,1	11,6
$\mu\text{M}/100 \text{ gpf.}$	26	12	16	20	13

TABLEAU XVII

NUCLEOTIDES NON ADENYLIQUES DU CERVEAU

LAPINS APRES TROIS MOIS DE REGIME

		IMP	CTP	GTP	GDP	UTP
Animaux d'expérience Résultats en $\mu\text{gP/gpf.}$	1	14	18	18	12	12
	2	12	15	12	12	14
	3	13	16	19	17	17
	4	12	15	18	17	12
	5	12	17	12	12	15
	6	14	12	18	13	9
	7	12	18	13	11	15
	8	11	12	15	12	10
	9	13	15	22	8	9
Moyennes en $\mu\text{gP/gpf.}$		12,5	15,8	16,3	12,6	12,5
$\mu\text{M}/100 \text{ gpf.}$		41	17	18	21	14

IV. — NUCLEOTIDES LIBRES DU TISSU MYOCARDIQUE

CONDITIONS DE PRELEVEMENT

Les animaux sont, également, sacrifiés par décapitation. Une ouverture médiane, rapide, de la cage thoracique par section du sternum permet de prélever le cœur. Libéré du péricarde et des vaisseaux afférents et efférents, celui-ci est lavé dans du sérum physiologique refroidi. 2 g de tissu sont prélevés à la partie apicale et traités comme il a été indiqué précédemment.

Là encore, nous avons évité de congeler cet organe, pour les raisons que nous avons mentionnées au début de ce chapitre.

RESULTATS

Les nucléotides adényliques représentent, pour cet organe comme pour les précédents, la majorité du phosphore total contenu dans les nucléotides libres (84 %). On constate la présence d'ATP, quantitativement le plus important des adényliques, d'ADP, d'AMP (en quantité très importante) et, enfin, de NAD.

L'influence du régime athérosclérogène se traduit, dès le premier mois, par une augmentation importante du taux d'ATP, accompagnée d'une élévation moindre des valeurs d'ADP et de NAD. Le taux d'AMP subit peu de modifications.

Au cours du deuxième mois, la quantité d'ATP diminue légèrement, en gardant, toutefois, une valeur supérieure à la valeur normale, cependant que l'ADP et le NAD reviennent aux valeurs antérieures à l'administration du régime et que l'AMP diminue significativement.

La fin du troisième mois montre une chute importante du taux d'ATP (53 % de la valeur normale), tandis que la quantité d'AMP

continue à diminuer (72 % de la valeur normale). Le NAD et l'ADP gardent, quant à eux, à peu près leur valeur normale.

Le rapport ATP/ADP, égal à 1,10 chez les animaux témoins, reste à peu près stationnaire pendant les premier et deuxième mois de régime, pour tomber à 0,60 à la fin du troisième mois. A ce moment, la teneur en nucléotides adényliques a diminué de 30 % par rapport à la valeur normale.

Au point de vue des nucléotides non adényliques, nous n'avons pas trouvé trace d'UTP, mais avons noté la présence d'IMP, de CTP, de GTP, de GDP et de GMP.

Au cours du régime, la teneur en IMP, stationnaire durant le premier mois, va augmentant, pendant les deuxième et troisième mois, pour atteindre, à la fin du traitement, une valeur supérieure au double de la normale. Le taux de CTP suit une évolution parallèle, un peu moins sensible, cependant. Le GTP, après une légère augmentation au cours du deuxième mois, revient à une valeur normale à la fin du troisième mois.

TABLEAU XVIII

NUCLEOTIDES ADENYLIQUES DU TISSU MYOCARDIQUE

LAPINS NORMAUX

		ATP	ADP	AMP	NAD
Animaux d'expérience - Résultats en $\mu\text{gP/gpf.}$	1	120	82	34	22
	2	122	84	38	23
	3	132	87	41	24
	4	154	89	43	29
	5	135	124	64	20
	6	126	72	33	21
	7	150	90	43	21
	8	134	81	34	24
	9	145	95	46	22
	10	143	95	47	22
	11	144	92	45	24
	12	148	92	47	30
	13	130	75	45	29
	14	134	83	45	22
$\bar{X} \pm \text{sm } (\mu\text{gP/gpf.})$		$136,9 \pm 2,8$	$88,7 \pm 3,3$	$43,1 \pm 2,1$	$23,8 \pm 0,8$
$\mu\text{M}/100 \text{ gpf.}$		152	148	143	40

TABLEAU XIX

NUCLEOTIDES ADENYLIQUES DU TISSU MYOCARDIQUE

LAPINS APRES 1 MOIS DE REGIME

		ATP	ADP	AMP	NAD
Animaux d'expérience Résultats en $\mu\text{gP/gpf.}$	1	180	103	45	35
	2	173	98	43	37
	3	175	108	37	32
	4	172	100	38	35
	5	177	99	38	38
	6	182	98	42	37
	7	175	95	35	32
	8	172	95	36	33
	9	165	92	41	32
$\bar{X} \pm \text{sm } (\mu\text{gP/gpf.})$		$174,5 \pm 1,6$	$98,6 \pm 1,6$	$39,4 \pm 1,1$	$34,5 \pm 1,2$
$\mu\text{M}/100 \text{ gpf.}$		194	165	133	58

TABLEAU XX

NUCLEOTIDES ADENYLIQUES DU TISSU MYOCARDIQUE

LAPINS APRES 2 MOIS DE REGIME

		ATP	ADP	AMP	NAD
Animaux d'expérience Résultats en $\mu\text{gP/gpf.}$	1	161	87	34	31
	2	160	94	37	22
	3	158	89	39	27
	4	163	91	35	21
	5	165	100	39	22
	6	171	96	31	21
	7	176	94	26	18
	8	159	93	38	32
$\bar{X} \pm \text{sm } (\mu\text{gP/gpf.})$		$\begin{matrix} 164 \\ \pm 2,2 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 93 \\ \pm 1,4 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 35 \\ \pm 1,5 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 24,2 \\ \pm 1,6 \end{matrix}$
$\mu\text{M}/100 \text{ gpf.}$		182	155	117	40

TABLEAU XXI

NUCLEOTIDES ADENYLIQUES DU TISSU MYOCARDIQUE

LAPINS APRES 3 MOIS DE REGIME

		ATP	ADP	AMP	NAD
Animaux d'expérience Résultats en $\mu\text{gP/gpf.}$	1	58	73	32	29
	2	80	87	33	28
	3	82	88	28	25
	4	87	83	38	19
	5	81	82	38	22
	6	73	79	31	19
	7	63	83	30	22
	8	80	80	27	20
	9	61	84	24	21
$\bar{X} \pm \text{sm } (\mu\text{gP/gpf.})$		$\begin{matrix} 73 \\ \pm 3,5 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 82 \\ \pm 1,5 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 31 \\ \pm 1,5 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 22 \\ \pm 1,2 \end{matrix}$
$\mu\text{M}/100 \text{ gpf.}$		81	136	103	36

TABLEAU XXII

NUCLEOTIDES NON ADENYLIQUES DU TISSU MYOCARDIQUE

LAPINS NORMAUX

		IMP	CTP	GTP	GDP	GMP
Animaux d'expérience - Résultats en $\mu\text{gP/gpf.}$	1	8	8	8	6	12
	2	9	9	7	9	13
	3	8	9	7	7	13
	4	15	11	6	7	12
	5	15	15	9	9	13
	6	12	12	6	10	12
	7	9	10	6	8	10
	8	8	13	7	10	13
	9	10	8	12	10	15
	10	10	8	9	9	8
	11	11	9	8	8	12
	12	8	10	7	7	10
	13	10	8	14	10	8
	14	8	10	12	12	8
Moyennes en $\mu\text{gP/gpf.}$		10,0	10,0	8,4	8,7	11,3
$\mu\text{M}/100 \text{ gpf.}$		33	11	9	14	37

TABLEAU XXIII

NUCLEOTIDES NON ADENYLIQUES DU TISSU MYOCARDIQUE

LAPINS APRES 1 MOIS DE REGIME

		IMP	CTP	GTP	GDP	GMP
Animaux d'expérience Résultats en $\mu\text{gP/gpf.}$	1	7	8	13	12	15
	2	7	9	10	8	8
	3	8	10	14	9	12
	4	9	9	15	10	10
	5	8	7	11	9	14
	6	15	13	8	7	11
	7	10	12	10	8	10
	8	10	9	8	7	12
	9	12	8	10	12	12
Moyennes en $\mu\text{gP/gpf.}$		9,5	9,4	11,0	9,1	11,5
$\mu\text{M}/100 \text{ gpf.}$		32	10	12	15	37

TABLEAU XXIV

NUCLEOTIDES NON ADENYLIQUES DU TISSU MYOCARDIQUE

LAPINS APRES 2 MOIS DE REGIME

		IMP	CTP	GTP	GDP	GMP
Animaux d'expérience Résultats en $\mu\text{gP/gpf.}$	1	17	9	12	9	11
	2	15	12	12	10	9
	3	19	14	15	13	12
	4	21	12	12	10	10
	5	14	11	16	12	14
	6	15	10	15	15	12
	7	15	15	12	10	10
	8	18	10	12	13	12
Moyennes en $\mu\text{gP/gpf.}$		16,7	11,6	13,2	11,5	11,2
$\mu\text{M}/100 \text{ gpf.}$		51	13	14	19	37

TABLEAU XXV

NUCLEOTIDES NON ADENYLIQUES DU TISSU MYOCARDIQUE

LAPINS APRES 3 MOIS DE REGIME

		IMP	CTP	GTP	GDP	GMP
Animaux d'expérience Résultats en $\mu\text{gP/gpf.}$	1	25	20	8	7	10
	2	26	19	10	7	10
	3	25	22	10	6	10
	4	24	18	8	10	12
	5	23	16	12	10	16
	6	25	18	12	9	14
	7	22	17	10	8	10
	8	23	20	10	10	12
	9	22	19	10	10	12
Moyennes en $\mu\text{gP/gpf.}$		23,9	18,7	10,0	8,5	11,7
$\mu\text{M}/100 \text{ gpf.}$		79	20	11	14	38

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Avant d'aborder la discussion de l'ensemble des résultats que nous avons obtenus au cours de ce travail, il nous paraît nécessaire de justifier le choix que nous avons fait en utilisant le lapin comme animal d'expérimentation.

En effet, nous avons été obligé d'écarter à priori, pour des raisons matérielles, de gros animaux tels que le porc. Parmi les autres animaux, nous avons été amené à écarter, également, le chien et le rat, chez lesquels il est très difficile d'induire un athérome expérimental.

Chez le chien, en particulier, le développement de l'athérome par surcharge lipidique est constamment freiné par une réaction interstitielle d'emblée très importante. Chez le lapin, au contraire, on réalise facilement un athérome expérimental lipidique, dont le stade initial est représenté par une surcharge xanthomateuse intense que l'épuration lymphatique, vite débordée, n'est pas à même de freiner.

De plus, il ressort des études histologiques effectuées au cours de l'athérome expérimental du lapin, qu'il existe une similitude structurale entre la plaque athéromateuse humaine au stade précoce et les plaques obtenues chez le lapin à un moment donné de l'évolution de cet athérome. L'imprégnation lipidique simple est, donc, susceptible de réaliser, chez cet animal, des lésions très voisines de celles de l'athérosclérose humaine.

Nous discuterons successivement les résultats obtenus dans les tissus hépatique, cérébral et myocardique.

I. — EVOLUTION DES NUCLEOTIDES LIBRES DU TISSU HEPATIQUE

Nous avons groupé dans le Tableau XXVI l'ensemble des valeurs des nucléotides adényliques contenus dans le tissu hépatique et leur évolution au cours du régime athérogène. Les moyennes sont exprimées en microgrammes de phosphore par gramme de poids frais ($\mu\text{gP/gpf}$) et sont suivies de l'erreur-type. Nous avons également exprimé ces valeurs moyennes en micromoles pour 100 grammes de poids frais ($\mu\text{M}/100 \text{ gpf}$) pour chaque nucléotide.

L'étude statistique des résultats a été conduite par analyse de variance selon le test F.

En ce qui concerne le tissu hépatique normal, nous avons mis en évidence la présence de nucléotides adényliques (mono-, di- et triphosphates d'adénosine et NAD) ; en outre, nous avons noté la présence de nucléotides guanyliques (mono-, di- et triphosphates de guanosine), d'UTP, de CTP et d'IMP.

Ces constatations sont comparables à celles de CEVELEVA et LIBINZON (1962). Nos résultats et ceux de ces auteurs diffèrent en deux points. Ils notent la présence de CMP, d'UMP et d'UDP, que nous n'avons pas retrouvés. Par contre, la présence de CTP n'est pas signalée au cours de leur expérimentation.

Les nucléotides adényliques représentent 80 % du phosphore total des nucléotides libres. Le NAD est le plus faiblement représenté, puis, par ordre d'importance croissante, nous relevons l'ATP, l'ADP et l'AMP. Les valeurs d'ATP sont très voisines de celles qui ont été observées chez d'autres animaux (le rat, en particulier).

Cependant, le fait marquant est la valeur très faible du rapport ATP/AMP qui est de 0,86. Notons, à cet égard, que CEVELEVA et LIBINZON avaient déjà constaté, au niveau du tissu hépatique du lapin, l'existence en quantités relativement faibles de polyphosphates dans les nucléotides libres.

Au cours du régime athérosclérogène, les modifications les plus sensibles portent sur l'ATP et l'ADP, comme le montrent les valeurs rassemblées dans le Tableau XXVI. Le taux d'ATP accuse une diminution progressive, significative dès la fin du premier mois (24 %), qui est de l'ordre de 31 % à la fin du troisième mois.

Le taux d'ADP subit une évolution du même type, de façon moins marquée, cependant, puisque la diminution est, au troisième mois, de l'ordre de 21 % du taux initial.

Le nombre restreint d'animaux en expérience au deuxième mois explique que la diminution observée ne soit pas statistiquement significative. Cette remarque s'applique également à l'AMP.

Contrairement à l'ATP et à l'ADP, le taux d'AMP n'est pas modifié de façon significative au cours du traitement. Il en est de même en ce qui concerne l'évolution du NAD, dont le taux n'est significativement abaissé qu'à la fin du troisième mois (18 %).

Le rapport ATP/ADP (Tableau XXVII), égal à 0,98 chez les animaux témoins, varie faiblement (jusqu'à 0,80) sous l'influence du régime.

Par ailleurs, on observe, à la fin du troisième mois de régime, une augmentation assez nette du taux d'IMP qui ne semble pas être liée à une augmentation de l'activité désaminasique, étant donné que le taux d'AMP reste pratiquement constant.

Enfin, on constate une diminution du taux des nucléotides guanyliques et uridyliques.

TABLEAU XXVI

NUCLEOTIDES ADENYLIQUES DU TISSU HEPATIQUE

	ATP				ADP			
	Témoins	1 mois	2 mois	3 mois	Témoins	1 mois	2 mois	3 mois
Nombre de cas	13	11	4	14	13	11	4	14
$\bar{X} \pm sm (\mu gP/gpf.)$	138,0 $\pm 8,5$	105,8 $\pm 7,2$	104,2 $\pm 5,2$	95,6 $\pm 4,8$	94,6 $\pm 4,1$	87,9 $\pm 9,2$	78,8 $\pm 5,2$	74,7 $\pm 4,9$
$\mu M/100$ gpf.	154	118	116	106	157	146	131	124
F		284,04	4,54	19,5		385	4	9,5
F (0,05)		4,30	4,54	4,24		4,30	4,54	4,24
F (0,01)		7,94	8,68	7,77		7,94	8,68	7,77
Signification		++	+	++		++	—	+

	AMP				NAD			
	Témoins	1 mois	2 mois	3 mois	Témoins	1 mois	2 mois	3 mois
Nombre de cas	13	11	4	14	13	11	4	14
$\bar{X} \pm sm (\mu gP/gpf.)$	53,5 $\pm 4,2$	62,6 $\pm 6,8$	35,8 $\pm 7,9$	55,9 ± 4	56,7 $\pm 3,7$	55,9 $\pm 10,4$	63,3 $\pm 9,9$	46,2 $\pm 1,6$
$\mu M/100$ gpf.	178	216	119	186	94	93	105	77
F		1,67	4,3	5,7		190	1,67	7,16
F (0,05)		248	4,60	249		248,5	245,5	4,24
F (0,01)		6208	8,86	6234		6212	6150	7,77
Signification		—	—	—		—	—	+

TABLEAU XXVII

*VARIATIONS DU RAPPORT ATP/ADP
AU COURS DU REGIME ATHEROSCLEROGENE*

		Rapport ATP/ADP			
		Témoins	1 mois	2 mois	3 mois
Organes	Cœur	1,10	1,18	1,18	0,60
	Cerveau	2,60	2,40	2,0	1,80
	Foie	0,98	0,81	0,89	0,80

Les résultats d'ensemble mettent en relief une diminution globale du taux des nucléotides adényliques que pourrait expliquer une atteinte de la synthèse d'ATP.

Soulignons que cette diminution globale peut se concevoir en partie si l'on considère la surcharge lipidique intense, extériorisée macroscopiquement, après le premier mois de régime, par l'aspect stéatosique du foie.

II. — EVOLUTION DES NUCLEOTIDES LIBRES DU TISSU CEREBRAL

Les résultats concernant les nucléotides adényliques sont rassemblés dans le Tableau XXVIII. Les valeurs moyennes sont suivies de l'erreur-type et l'étude statistique a été effectuée, comme précédemment, par analyse de variance selon le test F.

Nous relevons, chez les animaux normaux, la présence, dans le tissu cérébral, de nucléotides adényliques (mono-, di- et triphosphates d'adénosine et NAD). Ceux-ci représentent environ 70 à 75 % de la quantité totale de phosphore des nucléotides libres, mais sont en moins grande quantité, cependant, que dans le tissu hépatique. L'ATP est, relativement, le composé le plus important, puis viennent, par ordre décroissant, l'AMP, l'ADP et le NAD.

Nous avons, également, constaté la présence d'IMP, de CTP, de GTP, de GDP et d'UTP.

La répartition des nucléotides libres appelle une première remarque. En effet, si nos résultats sont comparables à ceux d'autres auteurs (KORANSKY, 1956 ; DORING et GERLACH, 1957 ; MANDEL et WEILL, 1962), il convient de souligner qu'il existe, entre les résultats de MANDEL, en particulier, et les nôtres, des différences portant, essentiellement, sur la présence de dérivés monophosphates de la cytosine et de la guanosine, mono- et diphosphates de l'uridine, que cet auteur ne retrouve, d'ailleurs, qu'en quantités très faibles. Cette différence tient, surtout, à la technique de séparation par chromatographie sur colonne de résine échangeuse d'ions qu'utilise MANDEL.

En ce qui concerne les taux d'ATP et d'ADP, nos résultats concordent parfaitement avec ceux de MANDEL et WEILL, mais sont très inférieurs à ceux de DORING et GERLACH. Ces résultats discordants doivent être discutés sur la base des modalités techniques du sacrifice de l'animal. En effet, pour les raisons que nous avons invoquées au chapitre « Résultats », nous avons sacrifié les animaux par décapitation sans anesthésie et disséqué le tissu cérébral sans congélation préalable, contrairement aux méthodes utilisées par ces auteurs. Rappelons, en particulier, que STONE (1940) avait montré que l'anesthésie entraînait une accumulation d'ATP par manque d'utilisation.

Par ailleurs, des travaux récents (EDEL et REIN-LOVTRUP, 1966) font état de valeurs d'ATP très supérieures ($213 \mu\text{M}/100 \text{ gpf}$) au lieu de $111 \mu\text{M}$ pour MANDEL et $92 \mu\text{M}$ dans nos résultats). D'après ces auteurs, cette différence pourrait être due, en partie, à la libération d'une fraction de nucléotides associés à des enzymes ou liés dans des complexes lipoprotéiques. Or, le protocole opératoire que nous avons suivi s'adresse uniquement à l'extraction des nucléotides libres.

La deuxième remarque que l'on peut faire concerne le NAD, que nous retrouvons en quantité appréciable ($34 \mu\text{M}/100 \text{ gpf}$) comme le note, également, KORANSKY (1956), mais qui n'est retrouvé qu'à l'état de traces par MANDEL et WEILL et en faibles quantités ($5,4 \mu\text{M}/100 \text{ gpf}$) par EDEL et REIN-LOVTRUP (1966).

Sous l'influence du régime athérosclérogène, on note une évolution parallèle du taux des nucléotides adényliques. En effet, on constate, au cours du deuxième mois de traitement, une augmentation significative du taux de ces nucléotides. Il faut souligner, cependant, qu'en fin de traitement, le taux d'ADP reste élevé (augmentation de 40 % par rapport à la valeur normale), alors que ceux de l'ATP, de l'AMP et du NAD reviennent à leurs valeurs initiales.

Si l'on considère la somme globale des nucléotides adényliques, on constate qu'elle n'est pratiquement pas modifiée à la fin du traitement, bien que l'on ait observé une augmentation significative au cours du deuxième mois.

TABLEAU XXVIII

NUCLEOTIDES ADENYLIQUES DU TISSU CEREBRAL

	ATP				ADP			
	Témoins	1 mois	2 mois	3 mois	Témoins	1 mois	2 mois	3 mois
Nombre de cas	14	10	8	9	14	10	8	9
$\bar{X} \pm sm$ ($\mu\text{gP/gpf.}$)	83,2 $\pm 1,7$	85,0 $\pm 2,1$	93,2 $\pm 1,5$	83,7 $\pm 1,9$	22 $\pm 1,1$	23,4 $\pm 1,1$	31,2 $\pm 1,8$	31,4 $\pm 2,2$
$\mu\text{M}/100 \text{ gpf.}$	92	94	103	93	36	39	52	52
F		2,3	16,1	36,5		1,3	23,7	25,7
F (0,05)		248,5	4,35	248		4,30	4,35	4,32
F (0,01)		6212	8,10	6208		7,94	8,10	8,02
Signification		—	+	—		—	++	++

	AMP				NAD			
	Témoins	1 mois	2 mois	3 mois	Témoins	1 mois	2 mois	3 mois
Nombre de cas	14	10	8	9	14	10	8	9
$\bar{X} \pm sm$ ($\mu\text{gP/gpf.}$)	26,0 $\pm 1,4$	27,9 $\pm 1,7$	32,7 $\pm 2,0$	23,2 $\pm 2,2$	20,3 $\pm 0,6$	18,9 $\pm 1,1$	28,3 $\pm 0,9$	21,5 $\pm 1,69$
$\mu\text{M}/100 \text{ gpf.}$	86	93	109	77	34	32	47	36
F		1,41	7,50	1,21		1,46	53,44	2,18
F (0,05)		248,5	4,35	4,32		4,30	4,35	248
F (0,01)		6212	8,10	8,02		7,94	8,10	6208
Signification		—	+	—		—	++	—

Le rapport ATP/ADP est de 2,6 chez les animaux témoins, valeur comparable à celle obtenue en 1962 par MANDEL et WEILL (3,1). Au cours de l'athérosclérose expérimentale, le rapport ATP/ADP baisse régulièrement pendant toute la durée du régime (cf. Tableau XXVII). Il tombe à 2,0 puis à 1,8, respectivement aux deuxième et troisième mois.

Les taux d'IMP et de CTP subissent une augmentation assez sensible au cours du régime, tandis que les valeurs des autres nucléotides libres sont pratiquement inchangées.

Il ressort de l'ensemble des résultats que la somme globale des nucléotides adényliques n'est pas modifiée de façon très notable, à la fin du traitement athérogène. On peut, par conséquent, difficilement invoquer une atteinte de la synthèse des nucléotides riches en énergie.

Il est donc permis de penser que les lésions cérébrales pouvant, éventuellement, survenir au cours de l'athérosclérose expérimentale, seraient, plus certainement, secondaires à l'atteinte des parois vasculaires, les seules modifications biochimiques sensibles au niveau du tissu cérébral (augmentation du CTP) étant, sans doute, liées à la perturbation du métabolisme lipidique.

III. — EVOLUTION DES NUCLEOTIDES LIBRES DU MYOCARDE

Le Tableau XXIX rassemble les résultats obtenus pour le tissu myocardique. Comme pour les autres organes, les moyennes sont suivies de l'erreur-type et leur signification a été étudiée par analyse de variance.

Les nucléotides libres se répartissent en dérivés mono-, di- et triphosphates de l'adénosine et NAD ; nous avons noté, également, la présence d'IMP, de CTP et des dérivés mono-, di- et triphosphates de la guanosine.

Nous n'avons pas relevé, dans la littérature, de travaux relatifs à la répartition des nucléotides libres du myocarde chez le lapin. Celle-ci a été étudiée, chez le rat, par BARBARESI et coll. (1963), qui ont mis en évidence, outre les nucléotides précédemment signalés, la présence d'UMP et d'UTP en quantités extrêmement faibles.

Les nucléotides adényliques représentent, dans le myocarde comme dans les tissus hépatique et cérébral, la majorité du phosphore total contenu dans les nucléotides libres (84 %). On relève, par ordre d'importance décroissante, l'ATP, l'ADP, l'AMP et le NAD, avec un rapport ATP/ADP égal à 1,1 chez les animaux témoins (Tableau XXVII).

En considérant dans leur ensemble les valeurs des nucléotides adényliques chez les animaux témoins, on est frappé par la quantité importante d'AMP retrouvée (143 μ M/100 gpf pour 152 μ M d'ATP, donnant un rapport ATP/AMP de l'ordre de 1,1).

Cette teneur élevée en AMP, assez surprenante dans un tissu musculaire, peut, en partie, s'expliquer par une activité ATPasique qu'il est difficile de prévenir lors de la dissection du tissu. Cependant, cette explication ne peut, à elle seule, rendre compte de l'accumulation du taux d'AMP, si l'on considère la très faible dispersion des résultats. En effet, si l'activité ATPasique liée à l'étirement et à la section des fibres musculaires au moment de la dissection était seule en cause, elle se traduirait, inévitablement, par une grande dispersion des valeurs individuelles, ce qui n'est pas le cas. On ne peut donc incriminer la technique elle-même.

Toutefois, par souci d'objectivité, nous n'envisagerons, dans l'interprétation des résultats, que les variations de la somme globale des nucléotides adényliques.

Sous l'influence du régime athérogène, on constate, au cours du premier mois de traitement, que l'ATP, l'ADP et le NAD ont une évolution parallèle. Leur taux augmente, en effet, respectivement de 27 %, 12 %, et 45 %. Par contre, le taux d'AMP ne varie pratiquement pas.

Au cours du deuxième mois, on observe une dissociation dans l'évolution de ces nucléotides. Le taux d'ATP diminue légèrement, tout en gardant une valeur supérieure à la normale (182 μ M au lieu de 152 μ M/100 gpf), alors que les taux d'ADP et de NAD reviennent aux valeurs antérieures à l'administration du régime. L'AMP diminue de façon significative.

Les modifications les plus importantes apparaissent à la fin du troisième mois et portent essentiellement sur le taux d'ATP qui baisse de façon très importante (cette diminution est, en effet, de l'ordre de 47 % par rapport aux valeurs témoins). Les taux d'ADP et de NAD ne sont pas modifiés de façon significative. Cependant, on note, pour l'AMP, une diminution significative de 28 % par rapport à la normale.

TABLEAU XXIX

NUCLEOTIDES ADENYLIQUES DU TISSU MYOCARDIQUE

	ATP				ADP			
	Témoins	1 mois	2 mois	3 mois	Témoins	1 mois	2 mois	3 mois
Nombre de cas	14	9	8	9	14	9	8	9
$\bar{X} \pm sm$ ($\mu\text{gP/gpf.}$)	136,9 $\pm 2,8$	174,5 $\pm 1,6$	164,0 $\pm 2,2$	73,0 $\pm 3,5$	88,7 $\pm 3,3$	98,6 $\pm 1,6$	93,0 $\pm 1,4$	82,0 $\pm 1,5$
$\mu\text{M}/100 \text{ gpf.}$	152	194	182	81	148	165	155	136
F		98,35	43,29	193,73		5,35	34,35	2,38
F (0,05)		4,32	4,35	4,32		4,32	248	4,32
F (0,01)		8,02	8,10	8,02		8,02	6208	8,02
Signification		++	++	++		+	—	—

	AMP				NAD			
	Témoins	1 mois	2 mois	3 mois	Témoins	1 mois	2 mois	3 mois
Nombre de cas	14	9	8	9	14	9	8	9
$\bar{X} \pm sm$ ($\mu\text{gP/gpf.}$)	43,1 $\pm 2,1$	39,4 $\pm 1,1$	35,0 $\pm 1,5$	31,0 $\pm 1,5$	23,9 $\pm 0,8$	34,5 $\pm 1,2$	24,3 $\pm 1,6$	22,0 $\pm 1,2$
$\mu\text{M}/100 \text{ gpf.}$	143	133	117	103	40	58	40	36
F		1,75	7,35	16,64		55,78	1,77	6
F (0,05)		4,32	4,35	4,32		4,32	4,35	248
F (0,01)		8,02	8,10	8,02		8,02	8,10	6208
Signification		—	+	++		++	—	—

L'évolution du rapport ATP/ADP dans le temps reflète l'évolution parallèle de ces nucléotides pendant les deux premiers mois de régime, mais tombe, à la fin du troisième mois, à une valeur moitié moindre du rapport normal (de 1,1 à 0,6).

Les résultats concernant les nucléotides non adényliques mettent en évidence des modifications intéressant uniquement les taux d'IMP et de CTP. Le fait le plus remarquable est l'augmentation progressive de la teneur en IMP qui atteint, à la fin du traitement, une valeur supérieure au double du taux normal. Cette augmentation du taux de l'IMP est, probablement, le reflet d'une augmentation de l'activité désaminasique du myocarde.

L'augmentation progressive que nous avons constaté du taux de CTP dans le temps pourrait traduire la perturbation du métabolisme lipidique due aux phénomènes de surcharge.

L'évolution globale des nucléotides adényliques dans le myocarde fait ressortir deux points importants à considérer.

Le premier est l'augmentation conjointe des taux d'ATP, d'ADP et de NAD au cours du premier mois, qui pourrait s'expliquer par une sorte de phénomène d'adaptation du myocarde, en réponse à la surcharge lipidique, se traduisant soit par une stimulation de l'activité glycolytique, soit par une augmentation du taux des phosphorylations oxydatives.

Le second fait marquant est la diminution de la somme des nucléotides adényliques, puisqu'à la fin du traitement, leur teneur globale a diminué de 30 % par rapport à la valeur normale. Cette baisse du taux des dérivés riches en énergie précède l'apparition des lésions histologiques macroscopiques. On peut, donc, penser que le développement de l'athérome expérimental s'accompagne d'une diminution du métabolisme énergétique.

Ces résultats d'ensemble sont particulièrement intéressants à considérer au niveau du myocarde, en raison d'une part, de l'influence de l'AMP et de l'ATP sur la contraction cardiaque et, d'autre part, de leur rôle d'effecteurs dans la régulation du métabolisme énergétique.

L'ensemble des variations que nous venons d'analyser montre, en effet, que c'est au niveau du tissu myocardique que s'observent les modifications les plus importantes. Le tissu hépatique ne montre qu'une faible diminution des phosphorylations oxydatives. Dans le tissu cérébral, exception faite pour le CTP, aucune variation notable ne peut être enregistrée.

Les constatations que nous avons pu faire au cours de ce travail soulèvent de nombreux problèmes, dont une étude approfondie permettrait seule d'asseoir les bases d'une interprétation solidement étayée et d'intégrer ces modifications métaboliques dans le contexte pathologique.

En effet, les variations observées du taux des nucléotides dans les différents tissus ne peuvent avoir qu'une valeur indicative, beaucoup moins évocatrice que, par exemple, les variations, à différents niveaux métaboliques, du taux des enzymes.

Dans le cas qui nous intéresse, il est évident que l'étude de la vitesse de renouvellement des nucléotides adényliques et des dérivés phosphorylés riches en énergie, tels que la phosphocréatine, serait une source précieuse de renseignements.

Ce travail, centré sur l'évolution des nucléotides adényliques, n'apporte qu'une modeste contribution à l'étude des modifications du métabolisme énergétique au cours de l'athérosclérose expérimentale. Il ne constitue qu'une méthode d'approche fournissant des hypothèses de travail qui ouvrent la voie à de nouvelles recherches.

CONCLUSIONS

L'étude des nucléotides libres de différents tissus a été effectuée par un grand nombre d'auteurs. Le nombre restreint de travaux concernant le tissu hépatique, le tissu cérébral et le myocarde, surtout dans les états pathologiques, nous a amené à étudier l'évolution de ces composés au cours de l'établissement et du développement du processus athéroscléreux expérimental.

Parmi les techniques très diverses mises au point à ce jour, et que nous avons résumées dans la première partie de notre travail, nous avons utilisé, comme moyen de séparation et de dosage des nucléotides libres, la méthode suivante :

- extraction de ces composés par l'acide trichloracétique,
- isolement des nucléotides sur colonne de charbon actif,
- élution par la pyridine,
- chromatographie bidimensionnelle sur papier.

Les fractions nucléotiques séparées ont été estimées par dosage du phosphore.

La comparaison des résultats que nous avons obtenus, pour les tissus précédemment cités, à l'état normal et sous l'influence du régime athérosclérogène a mis en évidence :

1. — Une diminution significative de la somme globale des nucléotides adényliques au niveau des tissus hépatique et myocardique, montrant une atteinte du métabolisme énergétique survenant en fin de traitement.

2. — Au niveau du myocarde, un processus possible d'adaptation à la surcharge lipidique, au cours du premier mois de régime.

3. — Aucune variation significative des nucléotides adényliques en fin de régime au niveau du tissu cérébral.

4. — En ce qui concerne les nucléotides non adényliques, une élévation du taux de CTP et d'IMP au niveau du myocarde, de CTP au niveau du tissu cérébral. Aucune variation n'a été enregistrée au niveau du tissu hépatique.

Il semble, par conséquent, que le régime athérosclérogène n'entraîne de modifications appréciables qu'au niveau des tissus myocardique et hépatique.

Vu, LE DOYEN :

J.-F. CIER

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE :

L. COLOBERT.

Vu et permis d'imprimer :

Lyon, le 1^{er} décembre 1966

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL
DE L'UNIVERSITÉ

P. LOUIS.

BIBLIOGRAPHIE

1. AMINOFF (D.), MORGAN (W. I. G.) & WATKINS (W. M.). — Studies in Immunochemistry. II. The action of dilute alkali on the N-acetylhexosamines and the specific blood-group mucoids. *Biochem. J.* (1952), 51, 379.
2. BARBARESI (F.), MASTANDREA (R.), RASTELLI (G.). — Nucleotidi liberi del miocardio di ratto. Ricerche sperimentale e applicazione clinica. *Minerva Cardioangiol.* (1964), 12, 65.
3. BERENBLUM (I.) & CHAIN (E.). — An improved method for the colorimetric determination of phosphate. *Biochem. J.* (1938), 32, 295.
4. BERGKVIST (R.). — The separation and estimation of nucleotides. *Acta chem. scand.* (1957), 11, 1465.
5. CEVELEVA (I. A.) & LIBINZON (R. E.). — Nucléotides libres de quelques tissus du lapin (Russe). *Biokhimiya*, S. S. S. R. (1962), 27 (2), 305.
6. CHAMBON (P.) & MANDEL (P.). — Les nucléotides libres du tissu splénique de rat. *Bull. Soc. Chim. Biol.* (1959), 41, 715.
7. CHMIELEWICZ (Z. F.) et ACARA (M.). — Quantitative two-dimensional thin-layer chromatography of Deoxyribonucleic Acid components. *Anal. Biochem.* (1964), 9, 94.
8. COHN (W. E.). — The Anion-exchange separation of ribonucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* (1950), 72, 1471.
9. COHN (W. E.) & BOLLUM (F. J.). — Chromatography and desalting of nucleotides with ammonium bicarbonate on anion-exchange columns. *Biochim. Biophys. Acta* (1961), 48 (3), 588.
10. COPER (H.). — Aenderungen des ATP-Gehaltes in Gehirn nach Einwirkung verschiedener zentralerregender Pharmaka. *Arch. exp. Path. Pharmacol.* (1956), 228, 143.
11. COPER (H.), HERKEN (H.) & KORANSKY (W.). — Wiederherstellung krampfhindernder Wirkungen der Hexachlorcyclohexane durch ein Adenosintriphosphorsäurepräparat. *Naturwissenschaften* (1954), 41, 531.
12. DORING (H. J.) & GERLACH (E.). — Säurelösliche Phosphorverbindungen des Gehirns unter dem Einfluss von Anoxie, Ischämie und narkotischen Stoffen. *Arch. exp. Path. Pharmacol.* (1957), 232, 271.
13. EDEL (S.), JUDES (C.), RAMUZ (M.), MANDEL (P.). — Nucléotides libres du cortex cérébral du rat adulte. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, (1965), 261 (18), 3695.
14. EDEL (S.) & MANDEL (P.). — Nucléotides libres du cerveau de rat au cours de la croissance. *J. Physiol. (Paris)*, (1965), 57, 606.

15. EDEL (S.) & POIREL (G.). — Evolution des nucléotides libres du cerveau de rat au cours de la croissance post-natale. *Bull. Soc. Chim. Biol.* (1966), 48 (8 - 9), 935.
16. EDEL (S.) & REIN-LOVTRUP (H.). — Nucléotides libres du système nerveux central des mammifères et de quelques vertébrés inférieurs. *Bull. Soc. Chim. Biol.* (1966) 48 (8 - 9), 915.
17. EGGLESTON (L. V.) & HEMS (R.). — Separation of Adenosine phosphates by paper chromatography and the equilibrium constants of the myokinase system. *Biochem. J.* (1952), 52, 156.
18. GRÉGOIRE (J.), GRÉGOIRE (J.) & LIMOZIN (N.). — Recherche sur les nucléotides des bactéries *micrococcus lysodeikticus*. I. Bactéries en phase stationnaire. *Bull. Soc. Chim. Biol.* (1958), 40, 767.
19. HANES (C. S.) & ISHERWOOD (F. A.). — Separation of the phosphoric esters on the filter paper chromatogram. *Nature* (London), (1949), 164, 1107.
20. HEALD (P. J.). — Analysis of radioactive phosphates in extracts of cerebral tissues. *Biochem. J.* (1956), 63, 235.
21. HENRY (J. C.), FREY (J.), GRAS (J.) & MOSKOVITCHENKO (J. F.). — Les nucléotides adényliques de l'Aorte au cours de l'Athérosclérose expérimentale. Communication à la Société Française de Biologie médicale. *Path. Biol.* (1966 - a), 14 (7 - 8), 469.
22. HENRY (J. C.) & GAUTHERON (D.). — Répartition des nucléotides et des dérivés phosphorylés du tissu aortique de lapins normaux et soumis à un régime hypercholestérolique. *Bull. Soc. Chim. Biol.* (1965), 57, 213.
23. HENRY (J. C.), GAUTHERON (D.) & GRAS (J.). — Fractions phosphorylées et nucléotides adényliques de l'aorte chez le lapin normal et soumis à un régime athérosclérogène. *C. R. Acad. Sci. Paris* (1964), 258, 3581.
24. HENRY (J. C.), GAUTHERON (D.), GRAS (J.) & FREY (J.). — Variations des nucléotides adényliques et des fractions phosphorylées du tissu aortique sous l'influence de l'adrénaline. *Bull. Soc. Chim. Biol.* (1965 - a), 57, 1941.
25. HENRY (J. C.), GAUTHERON (D.), GRAS (J.) & FREY (J.). — Evolution comparée des nucléotides adényliques de l'aorte normale et athéroscléreuse sous l'influence de l'adrénaline. In : Rapport des Huitièmes Journées Biochimiques Latines, Lisbonne (1965 - b).
26. HENRY (J. C.), GRAS (J.), MOSKOVITCHENKO (J. F.) & FREY (J.). — Evolution des fractions phosphorylées et des nucléotides adényliques du foie au cours de l'athérose expérimentale chez le lapin. *C. R. Acad. Sci. Paris* (1966 - b), 262, 99.
27. HURLBERT (R. B.), SCHMITZ (H.), BRUMM (A. F.) & POTTER (V.). — Nucleotide metabolism; chromatographic separation of acidsoluble nucleotides. *J. Biol. Chem.* (1954), 209, 23.
28. JAROSCEWICZ (K.) & LIÉBECO (C.). — Séparation chromatographique des nucléotides sur couche mince de DEAE cellulose. *Arch. Int. Physiol.* (1964), 72, 521.
29. KANIG (K.) & KORANSKY (W.). — Zur Identifizierung und Bestimmung des freien Nucleotiden des Gehirns. *Arch. exp. Pathol. Pharmak.* (1961), 241 (4), 484.

30. KEMPF (E.), FONTAINE (R.), MANDEL (P.). — Etude comparée des nucléotides libres adényliques et uridyliques des aortes de bovidés jeunes et âgés. *C. R. Soc. Biol.* (1961 - a), 155, 623.
31. KEMPF (E.), MANDEL (P.). — Nucléotides libres des aortes de bovidés adultes et âgés. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* (1961 - b), 253, 2155.
32. KENNEDY (E. P.). — The synthesis of CDP-choline, CDP-ethanolamine and related compounds. *J. Biol. Chem.* (1956), 222, 185.
33. KLETHI (J.) & MANDEL (P.). — Les nucléotides libres du cristallin de veau. *Biochim. Biophys. Acta* (1957), 24, 642.
34. KORANSKY (W.). — Fraktionierte Darstellung von Nucleotiden aus dem Gehirn von Ratten im Ruhestand und im Krampfenfall. *Arch. exp. Pathol. Pharmacol.* (1956), 228, 140.
35. KREBS (H. A.) & HEMS (R.). — Some reactions of adenosine and inosine phosphates in animal tissues. *Biochim. Biophys. Acta* (1953), 12, 172.
36. LEDERER (E.). — In : *Chromatographie*. Collection « Monographies de Chimie organique », Masson, Paris, 2 vol. (1960).
37. LEVENE (P. A.) & BASE (L. W.). — In : *Nucleic Acids. Chemical Catalog. Co. Inc.* New-York (1931).
38. LISSITZKY (S.), GRÉGOIRE (J.), LIMOZIN (N.), GRÉGOIRE (J.). — Etude des composés acidosolubles dans la glande thyroïde : nouveaux composés organiques iodés libres et nucléotides libres. *Biochim. Biophys. Acta* (1959), 35, 565.
39. MANDEL (P.). — Rôle du métabolisme de la paroi artérielle dans la genèse de l'athérome. *Arch. Sc. Medice* (1962), 113, 223.
40. MANDEL (P.) & HART (S.). — Les nucléotides acidosolubles de l'encéphale du rat et du lapin. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, (1957), 245, 1843.
41. MANDEL (P.) & HART (S.). — Nucléotides du cerveau de quelques espèces de mammifères. *J. Physiol. (Paris)*, (1960), 52 (1), 166.
42. MANDEL (P.) & KEMPF (E.). — Nucléotides libres du tissu aortique. *Biochim. Biophys. Acta* (1961), 51, 184.
43. MANDEL (P.) & KLETHI (J.). — Répartition des nucléotides libres du cristallin de veau. *Biochim. Biophys. Acta* (1958), 28, 199.
44. MANDEL (P.), KLETHI (J.) & VIRMEAUX (N.). — Répartition des nucléotides libres du cristallin des bovidés jeunes et âgés. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, (1958), 246, 2942.
45. MANDEL (P.), PANTESCO (V.) & VIAUD (J.). — Métabolisme artériel, vieillissement et athérome. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, (1958), 246, 2062.
46. MANDEL (P.) & WEILL (J. D.). — Nucléotides du système nerveux central. *J. Physiol. (Paris)*, (1962), 54 (1), 199.
47. MARKHAM (R.) & SCHMITH (J. D.). — Cyclic nucleotides produced by Ribonuclease and by alkaline hydrolysis. *Biochem. J.* (1952), 52, 552.
48. PALADINI (A. C.) & LEROIR (L. F.). — Studies on Uridine-Diphosphate-Glucose. *Biochem. J.* (1952), 51, 426.
49. PECHAN (I.) & MARKO (P.). — Free nucleotides of the nervous tissue. III. Free nucleotides in the brain and liver of guinea pigs. *Biologia, Tcheosl.* (1963), 18 (5), 377.

50. RAMUZ (M.) & MANDEL (P.). — Effet des hormones sur la répartition des nucléotides adényliques libres du cerveau de rat. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, (1963), 256, 4523.
51. RANDERATH (K.). — Thin-layer chromatography of nucleotides on layers of cellulose ion-exchangers. *Nature (London)* (1962 - a), 194 (4830), 768.
52. RANDERATH (K.). — Comparison between thin-layer and paper chromatography of nucleic acid derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1962 - b), 6, 452.
53. RANDERATH (K.). — Chromatography of nucleotides on a new anion-exchanger paper. *J. Chromatogr.* (1963), 10, 235.
54. REISSIG (J. L.), STROMENGER (J. L.) & LELOIR (L. F.). — A modified colorimetric method for the estimation of N-acetyl amino sugars. *J. Biol. Chem.* (1955), 217, 959.
55. SAUKHONEN (J. J.). — Ueber das Vorkommen von freien Nucleotiden in ruhenden und wachsenden Geweben. *Ann. Med. exp. Fenniae* (1956), 34 (supp. 3), 1.
56. SCHMITZ (H.), HURLBERT (R. B.) & POTTER (V.). — Nucleotide metabolism; mono, di and triphosphates of cytidine, guanosine and uridine. *J. Biol. Chem.* (1954 - a), 209, 41.
57. SCHMITZ (H.), POTTER (V.), HURLBERT (R. B.), WHITE (D. M.). — Alternative pathways of glucose metabolism; nucleotides from acid-soluble fraction of normal and tumor tissues and studies on nucleic acid synthesis in tumors. *Canc. Res.* (1954 - b), 14, 66.
58. SCHMITZ (H.), POTTER (V.) & HURLBERT (R. B.). — Isolierung von freien Nucleotiden aus verschiedenen Geweben; weiteren Untersuchungen über den Bestand des Flexner-Jobling Carcinoms der Ratte an Nucleosid mono und polyphosphorsäureestern. *Ztschr. Krebsforsch.* (1955), 60, 419.
59. STONE (W. E.). — Acid soluble phosphorus compounds and lactic acid in the brain. *J. Biol. Chem.* (1940), 135, 43.
60. STREHLER (B. L.) & TOTTER (J. R.). — In : GLICK (D.). *Methods of Biochemical Analysis*. Interscience Publ. (1954), 1, 341.
61. SU (J. C.) & HASSID (W. Z.). — Identification of Guanosine Diphosphate L Galactose, Guanosine Diphosphate D Mannose, and Adenosine 3', 5' - Pyrophosphate from red alga, *Porphyra perforata*, J. J. Agardh. *J. Biol. Chem.* (1960), 235, P. C. 36.
62. TSUBOI (K. K.) & PRICE (T. D.). — Isolation, detection and measure of microgram quantities of labeled tissues nucleotides. *Arch. Biochem.* (1959), 81 (1), 223.
63. UMBREIT (W. W.), BURRIS (R. H.) & STAUFFER (J. F.). — In : *Manometric Methods* Burgess. Publ. Co., Minneapolis (1957).
64. VOLFIN (P.), CLAUSER (H.), GAUTHERON (D.) & EBOUE (D.). — Influence de l'œstradiol et de la progestérone sur le niveau des nucléotides et de la phosphocréatine dans l'utérus de rat. *Bull. Soc. Chim. Biol.* (1961), 43, 107.
65. WADE (H. E.) & MORGAN (D. M.). — The Analysis of Adenosine Triphosphate and Adenosine Diphosphate preparations by paper ionophoresis. *Biochem. J.* (1954), 56, 41.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	21
CHAPITRE PREMIER	23
CHAPITRE II. — TECHNIQUES D'ISOLEMENT ET DE DOSAGE DES NUCLEOTIDES	33
I. — Généralités	35
II. — La chromatographie en couche mince	37
III. — La chromatographie sur papier échangeur d'anions	41
IV. — L'ionophorèse à haute tension	43
1. Préparation des extraits	43
2. Préparation du papier	44
3. Ionophorèse	44
4. La détermination quantitative du phosphore	45
V. — La chromatographie sur colonne	47
1. Préparation de la fraction acidosoluble	47
2. Préparation de la colonne	48
3. L'élution	48
Systèmes standards de gradient d'élution	50
4. Analyse et rechromatographie	52
Elimination de l'éluant	53
Analyse des fractions en lumière U. V.	54
Calcul des concentrations	55

VI. — <i>La chromatographie bidimensionnelle sur papier</i>	57
1. Adsorption des nucléotides sur colonne de charbon activé ..	58
2. Préparation du papier	58
3. Chromatographie	59
a) Dépôts	59
b) Matériel	60
c) Solvants utilisés	61
4. Dosage des nucléotides	67
a) Minéralisation	67
b) Dosage selon la technique de Berenblum et Chain	67
CHAPITRE III. — RESULTATS	69
1. — <i>Généralités</i>	71
II. — <i>Nucléotides libres du tissu hépatique</i>	75
III. — <i>Nucléotides libres du cerveau</i>	91
IV. — <i>Nucléotides libres du tissu myocardique</i>	111
CHAPITRE IV. — DISCUSSION	131
I. — <i>Evolution des nucléotides libres du tissu hépatique</i>	135
II. — <i>Evolution des nucléotides libres du tissu cérébral</i>	143
III. — <i>Evolution des nucléotides libres du myocarde</i>	149
CONCLUSIONS	157
BIBLIOGRAPHIE	159

